

**Rolle der Isoenzyme COX-1 und COX-2 bei der
Entstehung und Aufrechterhaltung
entzündungsinduzierter Hyperexzitabilität nozizeptiver
Hinterhornneurone**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Anne-Kathrin Neubert
geboren am 18.08.1979 in Karl-Marx-Stadt

Gutachter 1: Prof. Dr. med. H.-G. Schaible, Institut für Neurophysiologie der FSU Jena
Gutachter 2: Prof. Dr. med. O. W. Witte, Klinik für Neurologie, Jena
Gutachter 3: Prof. Dr. med. W. Jänig, Institut für Physiologie der CAU Kiel

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.05.2006

„Erfahrung heißt gar nichts,
man kann eine Sache auch
20 Jahre lang falsch machen.“

(Kurt Tucholsky)

Abb.	Abbildung
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-Isoxazol
ATP	Adenosintriphosphat
BL	Baseline
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
CaCl	Kalziumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CFA	complete Freund's adjuvant – komplettes Freund'sches Adjuvans
CGRP	Calcitonine gene-related peptide
cm	Zentimeter
COX	Cyclooxygenase
COX-2-li	Cyclooxygenase-2-Immunreaktivität
DMF	Dimethylformamid
DP	Prostaglandin D-Rezeptor-Subtyp
EP	Prostaglandin E ₂ -Rezeptor-Subtyp
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoff-Ion
HT	high threshold
HCl	Salzsäure
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intrathekal
i.v.	intravenös
IL	Interleukin
IP	Prostaglandin I-Rezeptor-Subtyp
K/C	Kaolin und Carrageenan
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
M	Molar
mg	Milligramm
mg/kg KG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht

Mg ²⁺	Magnesium-Ion
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
n	Anzahl
N/mm ²	Newton pro Quadratmillimeter
Na ⁺	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ CO ₃	Natriumhydrogenbikarbonat
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NGF	Nerve growth factor
NKA	Neurokinin A
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
NO	Stickoxid
NSAIDs	non steroidal anti-inflammatory drugs – Nicht-steroidale anti-inflammatorische Analgetika
PG	Prostaglandin
PKA	Proteinkinase A
s	Sekunde
SD	standard deviation – Standardabweichung
SEM	standard error mean – Standardfehler des Mittelwertes
SP	Substanz P
Tab.	Tabelle
V	Volt
WDR	wide dynamic range
%-ig	prozentig
° C	Grad Celsius
Ω	Ohm

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINFÜHRUNG.....	4
2.1. SCHMERZ UND NOZIZEPTION	4
2.1.1. Definition	4
2.1.2. Anatomische und physiologische Grundlagen der Nozizeption	5
2.1.3. Innervation von Gelenken	6
2.2. ENTZÜNDUNG UND PLASTIZITÄT DES NOZIZEPTIVEN SYSTEMS	7
2.2.1. Periphere Sensibilisierung.....	8
2.2.2. Zentrale Sensibilisierung.....	9
2.3. CYCLOOXYGENASEN, PROSTAGLANDINE UND NSAIDS	11
2.3.1. Vorkommen und Funktionen der COX-Isoformen	11
2.3.2. Veränderungen im COX-Prostaglandin-System während entzündlicher Vorgänge und ihr Einfluß auf das periphere nozizeptive System.....	13
2.3.3. Lokalisation und Regulation der Cyclooxygenasen im Rückenmark	14
2.3.4. Spinale Prostaglandine	16
2.3.5. Zentrale Wirkmechanismen von COX-Inhibitoren.....	18
2.4. ZIEL DER ARBEIT	19
3. MATERIAL UND METHODIK	21
3.1. EXTRAZELLULÄRE ABLEITUNG	21
3.1.1. Herstellung der Elektroden.....	21
3.1.2. Registrierung und Verarbeitung neuronaler Aktivität.....	22
3.2. VERSUCHSVORBEREITUNG	23
3.2.1. Narkose und Überwachung der Vitalparameter	23
3.2.2. Erzeugen der Entzündung	24
3.2.3. Präparation	24
3.2.4. Abgrenzung des Ableitgebietes.....	25
3.2.5. Aufsuchen und Charakterisierung von Neuronen	25
3.3. TESTSUBSTANZEN	27
3.4. VERSUCHSPROTOKOLLE	28
3.4.1. Mechanische Reizung von Knie, Sprunggelenk und Pfote	28
3.4.2. Protokolle der einzelnen Testsubstanzen	28
3.4.2.1. Applikation vor Induktion der Entzündung	29
3.4.2.2. Applikation 6-8 h nach Induktion der Entzündung.....	29
3.5. DATENANALYSE UND STATISTIK	32
4. ERGEBNISSE	34
4.1. CHARAKTERISIERUNG DER SPINALEN NEURONE.....	34
4.1.1. Lokalisation und Klassifikation	34
4.1.2. Rezeptive Felder.....	34

4.2. EINFLUß DER SPINALEN APPLIKATION VON L-745,337 UND SC-560 AUF DIE ENTSTEHUNG ENTZÜNDUNGSINDUZIERTER HYPEREXZITABILITÄT	36
4.2.1. Effekt der spinalen Applikation von L-745,337 3 mM	36
4.2.2. Effekt der spinalen Applikation von SC-560 3 mM	38
4.3. UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG VON L-745,337, INDOMETACIN, DICLOFENAC UND SC-560 BEI ETABLIERTER SPINALER HYPEREXZITABILITÄT	41
4.3.1. Effekt der spinalen und systemischen Applikation von L-745,337	41
4.3.1.1. Spinale Applikation	41
4.3.1.2. Systemische Gabe	43
4.3.1.3. Spinale Applikation von L-745,337 über 200 min	44
4.3.2. Effekt von spinalem L-745,337 und der anschließenden simultanen Applikation von PGE ₂ und L-745,337	45
4.3.3. Effekt der spinalen und systemischen Applikation von SC-560	47
4.3.4. Effekt der spinalen Applikation von Indometacin und Diclofenac	48
4.3.5. Effekt der spinalen Applikation von SC-560 in Kombination mit L-745,337	49
4.4. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	50
 5. DISKUSSION	51
5.1. METHODISCHE ÜBERLEGUNGEN	51
5.1.1. Präparation und Narkose	51
5.1.2. Mechanische Reizung	51
5.1.3. Selektivität der Testsubstanzen	52
5.2. CHARAKTERISIERUNG DER UNTERSUCHTEN NEURONE	53
5.3. WIRKUNG DER SPINALEN APPLIKATION VON COX-INHIBITOREN	55
5.3.1. Effekt von spinalem L-745,337 und SC-560 im nicht entzündeten Tier	55
5.3.2. Effekt von spinalem L-745,337 und SC-560 während der Entstehung spinaler Hyperexzitabilität	56
5.3.3. Effekt von L-745,337, SC-560, Indometacin und Diclofenac bei etablierter Hyperexzitabilität	60
5.4. SYSTEMISCHE WIRKUNG VON L-745,337 UND SC-560 BEI ETABLIERTER HYPEREXZITABILITÄT	64
5.5. SCHLUSSFOLGERUNGEN	65
 LITERATURVERZEICHNIS	67
 ANHANG	79
DANKSAGUNG	79
LEBENS LAUF	80
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	81

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: Aktivierbarkeit der Neurone	35
TABELLE 2: Antworten nozizeptiver Hinterhornneurone unter Einwirkung von L-745,337 während der Entwicklung einer akuten Kniegelenkentzündung	37
TABELLE 3: Antwortverhalten spinaler Neurone unter Einwirkung von SC-560 während der Entwicklung einer akuten Kniegelenkentzündung	39
TABELLE 4: Einfluß von L-745,337 in unterschiedlicher Dosierung auf die neuronale Erregbarkeit bei etablierter Hyperexzitabilität	43
TABELLE 5: Effekt von spinalem L-745,337 bei bestehender Entzündung im Zeitverlauf	44

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: Isoformen der Cyclooxygenase	12
ABBILDUNG 2: Spikes - Neuronale Antwort auf noxische Reizung des Knies	21
ABBILDUNG 3: Schematische Darstellung des Meßstandes	23
ABBILDUNG 4: Darstellung der Versuchsprotokolle im Zeitverlauf	31
ABBILDUNG 5: Effekt der spinalen Applikation von L-745,337 auf die Entwicklung spinaler Übererregbarkeit während einer Entzündung im Kniegelenk	38
ABBILDUNG 6: Effekt der spinalen Applikation von SC-560 vor und während der Entstehung einer akuten Kniegelenkentzündung	40
ABBILDUNG 7: Effekt von L-745,337 auf das Antwortverhalten hyperexzitabler Hinterhornneurone im Zeitverlauf	42
ABBILDUNG 8: Effekt von L-745,337 bei spinaler und nachfolgender intraperitonealer Applikation bei etablierter Hyperexzitabilität	43
ABBILDUNG 9: Auswirkung von spinalem L-745,337 und der anschließenden simultanen Applikation von PGE ₂ und L-745,337 auf das Antwortverhalten übererregbarer Neurone	46
ABBILDUNG 10: Effekt der spinalen und systemischen Applikation von SC-560 auf das Antwortverhalten übererregbarer nozizeptiver Hinterhornneurone	47
ABBILDUNG 11: Effekt von spinalem Indometacin bzw. Diclofenac auf die neuronalen Antworten nach entstandener Übererregbarkeit, sowie Einfluß anschließender L-745,337-Applikation	48
ABBILDUNG 12: Effekt der simultanen Anwendung von L-745,337 und SC-560 mit nachfolgender alleiniger Applikation von L-745,337 auf das Rückenmark	49

1. ZUSAMMENFASSUNG

Nichtsteroidale Analgetika, die die Synthese von Prostaglandinen hemmen, werden in großem Umfang therapeutisch zur Beeinflussung akuter und chronischer Schmerzzustände eingesetzt. Infolge einer peripheren Schädigung kommt es nicht nur zu einer erhöhten Erregbarkeit peripherer Nozizeptoren, sondern auch im Rückenmark findet ein Wandel in der Verarbeitung nozizeptiver Information statt. Dieser Prozeß wird zentrale Sensibilisierung genannt und resultiert in einer Absenkung der Erregungsschwellen und Verstärkung der Antworten von spinalen Neuronen bei Reizung des entzündeten Gewebes, aber auch des benachbarten gesunden Gewebes. Untersuchungen der letzten Jahre belegen, dass Prostaglandine bei dieser im Rahmen einer Entzündung entstehenden Übererregbarkeit nozizeptiver Rückenmarkneurone eine Rolle spielen können. Prostaglandine entstehen aus Arachidonsäure durch Einwirkung der Cyclooxygenasen (COX). Auf spinaler Ebene werden die COX-Isoenzyme 1 und 2 basal exprimiert. Entsteht peripher eine Entzündung, wird aber vor allem die m-RNA der COX-2 in Hinterhornneuronen verstärkt gebildet. Die entstehenden Prostaglandine bewirken über die Bindung an präsynaptische Prostaglandin-Rezeptoren letztendlich u.a. eine gesteigerte Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren. An postsynaptischen Membranen können sie einwärtsgerichtete Ströme hervorrufen bzw. Neurone im tiefen Hinterhorn depolarisieren. Dies führt zu einer erleichterten und verstärkten Erregungsübertragung im Rückenmark.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte am Modell der Kaolin/Carrageenan-induzierten akuten Arthritis bei der Ratte die Untersuchung der Beteiligung von COX-1 bzw. 2 an der Entstehung und Aufrechterhaltung spinaler Übererregbarkeit. Die direkten spinalen Effekte einer Reihe von COX-Hemmstoffen standen dabei im Mittelpunkt. Mittels extrazellulärer Ableitung wurden Veränderungen im Antwortverhalten von Hinterhornneuronen mit nozizeptivem Eingang aus dem Knie auf mechanische Reize nicht-noxischer und noxischer Intensität gemessen und dabei folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Verändert die spinale Applikation von L-745,337 (selektiver COX-2-Inhibitor) bzw. SC-560 (selektiver COX-1-Inhibitor) die Antworten nozizeptiver Hinterhornneurone auf mechanische Reize im Tier ohne Entzündung?
- Welchen Einfluß hat die selektive Hemmung der COX-Isoenzyme durch L-745,337 bzw. SC-560 im Rückenmark auf die Entwicklung entzündungsinduzierter Übererregbarkeit spinaler Neurone?

- Reduziert die spinale Applikation von COX-Inhibitoren die neuronalen Reizantworten bei bestehender zentraler Sensibilisierung bzw. gibt es einen Unterschied zwischen selektiven und nicht-selektiven Wirkstoffen?
- Welchen Effekt hat die systemische Applikation von L-745,337 und SC-560 auf das Antwortverhalten nozizeptiver Hinterhornneurone bei etablierter Übererregbarkeit?

Die spinale Applikation von L-745,337 konnte einerseits die Entstehung entzündungs-induzierter spinaler Übererregbarkeit vollständig verhindern. Auf der anderen Seite reduzierte sie dosisabhängig die Antworten nozizeptiver Hinterhornneurone auf mechanische Reize, wenn diese Neurone durch die Entzündung bereits sensibilisiert waren. Die Reduktion der Antworten wurde durch die gleichzeitige spinale Applikation von PGE₂ abgeschwächt und zumindest teilweise aufgehoben. Unter Einwirkung von SC-560 vor und während der Entzündungsentstehung im Kniegelenk zeigte sich in den ersten zwei Stunden nach K/C-Injektion eine Verzögerung der typischen Aktivitätszunahme neuronaler Antworten. Danach stiegen die Antworten jedoch rasch an und vier Stunden nach Induktion der Entzündung war kein Unterschied zu den unbehandelten Kontrolltieren mehr nachweisbar. Bei etablierter Hyperexzitabilität der Rückenmarkneurone konnten spinal appliziertes SC-560, sowie auch die nicht-selektiven COX-Inhibitoren Indometacin und Diclofenac, die Antworten auf mechanische Reize nicht beeinflussen. Interessanterweise trat auch während der zeitgleichen spinalen Applikation von L-745,337 und SC-560 keine Veränderung des Antwortverhaltens hyperexzitabler Hinterhornneurone auf. Während einer etablierten Kniegelenkentzündung reduzierte die intraperitoneale Injektion sowohl von L-745,337 als auch von SC-560 die Reizantworten.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, daß spinale Prostaglandine bei der Entstehung der zentralen Sensibilisierung eine wesentliche Rolle spielen. In der Frühphase der Entzündung katalysieren vermutlich konstitutiv im Rückenmark vorhandene COX-1- und COX-2-Moleküle die Prostaglandinbildung, während später durch die entzündungsbedingt stark vermehrte Expression hauptsächlich die COX-2 zu deren Synthese beiträgt. Im Verlauf der Entzündung ändert sich die Rolle der Prostaglandine im Rückenmark. Es werden dann möglicherweise komplexe persistierende Veränderungen auf spinaler Ebene initiiert, die einer Modulation durch Prostaglandine nicht mehr im gleichen Ausmaß zugänglich sind. Für diese Vermutung spricht die Tatsache, daß spinal applizierte unselektive COX-Inhibitoren sowie der selektive COX-1-Inhibitor 6-8 h nach Entzündungsinduktion nicht zu einer Antwortreduktion in den Hinterhornneuronen führten, sondern nur bei systemischer Applikation eine

antinozizeptive Wirkung zeigten. Die ähnlich starke therapeutische Wirksamkeit nicht-selektiver COX-Inhibitoren beruht folglich wahrscheinlich auf der Prostaglandinsynthese-Hemmung im Entzündungsgebiet. Für die ausgeprägte zentrale antihyperalgetische Wirkung von L-745,337 bei etablierter spinaler Übererregbarkeit müssen allerdings neben der Hemmung der COX-2 alternative, nicht COX- bzw. Prostaglandin-assoziierte Wirkmechanismen in Betracht gezogen werden. Die Erforschung dieser Mechanismen und die Beleuchtung der Veränderungen in chronischen Entzündungsmodellen stellen einen äußerst interessanten Forschungsansatz dar.

2. EINFÜHRUNG

2.1. Schmerz und Nozizeption

Schmerzen spielen im klinischen Alltag eine große Rolle. Besonders Menschen, die unter chronischen Schmerzen leiden, sind enormen seelischen und körperlichen Belastungen ausgesetzt und empfinden sie als starke Einschränkung ihrer Lebensqualität. In Deutschland waren im Jahr 1994 laut einer Hochrechnung 5 Millionen Menschen von „lebensbestimmenden chronischen Schmerzen“ betroffen, ein Großteil davon verursacht durch entzündliche und degenerative Erkrankungen der Gelenke (Zimmermann, 1994). Die Behandlung dieser Schmerzzustände ist nach wie vor überaus problematisch. Zum einen nimmt die Wirkung herkömmlicher Schmerzmittel mit zunehmender Behandlungsdauer ab, zum anderen ist ihre Anwendung durch das Auftreten teilweise schwerer Nebenwirkungen limitiert.

Vor diesem Hintergrund wird die Notwendigkeit der Erforschung der neurophysiologischen Grundlagen nozizeptiver Mechanismen deutlich, um in Zukunft bessere therapeutische Konzepte der Schmerzbekämpfung entwickeln zu können.

2.1.1. Definition

„Verschiedene Arten des Schmerzes. Manchmal unter dem Fuß, wie eine Schnittwunde, winzig klein - ein Haarriß. Oder aber Stiche eines Taschenmessers unter dem Zehennagel.

Die Qualen »spanischer Stiefel« an den Knöcheln. Spitze Rattenzähne, an den Zehen nagend.“ (Daudet, 2003)

Schnörkellos, sarkastisch und frei von jedem Selbstmitleid notierte Alphonse Daudet zwischen 1887 und 1895 viele Facetten des Schmerzes, wie er sie im Endstadium der Syphilis durchlebte. Diese Schilderung zeigt, wie subjektiv und persönlich Schmerz wahrgenommen wird und macht eine Definition schwierig. Von den zahlreichen Versuchen, den Begriff Schmerz wissenschaftlich mit wenigen Worten zu charakterisieren, sei hier die Auffassung der International Association for the Study of Pain genannt. Sie definiert Schmerz als ein *„unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebsschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Beschädigung beschrieben wird“* (IASP, 1979).

Der Schmerz ist demnach eine komplexe Sinneswahrnehmung, die durch die Störung des Wohlbefindens eine lebenswichtige Warnfunktion besitzt. Unter Umständen kann er aber auch dann auftreten, wenn eine Gewebeschädigung gar nicht stattfindet. In chronischen Formen erlangt der Schmerz als Zustand, dem eine komplexe pathophysiologische Fehlsteuerung des peripheren und zentralen Nervensystems zugrunde liegt (Coderre et al., 1993; Schaible & Grubb, 1993) einen eigenständigen Krankheitswert.

In Abgrenzung vom Begriff Schmerz als mehrdimensionales psycho-physisches Geschehen, das vom Bewußtsein abhängig ist und durch Emotionen beeinflusst wird, prägte Sir Charles Sherrington 1906 die Bezeichnung Nozizeption. Unter Nozizeption versteht man die Summe der physiologischen Prozesse, die an der Aufnahme, Weiterleitung und Verarbeitung noxischer, i.e. schadhafter Signale beteiligt sind - ohne Beachtung der emotionalen und kognitiven Komponente. Dieses reduktionistische naturwissenschaftliche Konzept erleichtert den Zugang zur Erforschung der Mechanismen, die bei der Schmerzentstehung eine Rolle spielen. Nozizeption kann auch ohne Schmerz, z.B. bei ausgeschaltetem Bewußtsein, vorhanden sein. Andererseits tritt Schmerz, besonders in chronischen Verläufen, manchmal auch ohne erkennbare Nozizeption auf.

2.1.2. Anatomische und physiologische Grundlagen der Nozizeption

Die Spezifitätstheorie des Schmerzes geht davon aus, daß dieser eine eigenständige Sinnesmodalität mit einem weitgehend dafür spezialisierten nervösen Apparat ist (Perl, 1984). Noxische mechanische, thermische oder chemische Stimuli können spezialisierte sensorische Endigungen von Nozizeptoren aktivieren, deren Zellkörper in den Spinalganglien liegen. Praktisch alle Gewebe enthalten solche meist polymodalen Nozizeptoren unterschiedlicher Schwelle, deren Terminalstrukturen sich als nichtkorpuskuläre „freie“ Nervenendigungen im Gewebe verzweigen. Die nozizeptive Information, welche über dünn-myelinisierte, langsam leitende A δ -Fasern oder marklose C-Fasern zum Hinterhorn des Rückenmarkes geleitet wird, ist in der Entladungsaktivität dieser Afferenzen verschlüsselt. Mit zunehmender Intensität des Reizes steigt die Frequenz der generierten Aktionspotentiale.

Im Rückenmark enden die zentralen Fortsätze der Fasern vor allem an Neuronen in den Laminae I, II, V und X (nach Rexed). Ein Rückenmarkneuron erhält dabei konvergenten Einstrom von mehreren nozizeptiven als auch nicht-nozizeptiven Afferenzen aus demselben Organ oder aus verschiedenen Organen. Die synaptische Übertragung der Erregung wird chemisch durch Neurotransmitter (v.a. Glutamat) vermittelt. Ein Teil der Neurone des Hinterhornes ist Ausgangspunkt der Vorderseitenstrangbahnen (Tractus spinothalamicus u.a.),

die die Informationen an den Thalamus vermitteln. Andere Nervenzellen sind über Interneurone in motorische und vegetative Reflexbögen eingebunden. Vom Thalamus werden die nozizeptiven Signale an den Kortex weitergeleitet, was schließlich zur bewußten Schmerzempfindung führt. Die spinale nozizeptive Verarbeitung wird durch descendierende Hemmung moduliert (Handwerker, 1998).

2.1.3. Innervation von Gelenken

Gelenknerven enthalten verschiedene Arten von Fasern, die sich sowohl im Myelinisierungsgrad und somit in der Leitungsgeschwindigkeit unterscheiden, als auch in der Information die sie vorrangig übertragen. Afferenzen, die sensorische Informationen aus dem Gelenk an das zentrale Nervensystem weiterleiten, werden in myelinisierte (dick myelinisiert: Gruppe II- bzw. A β -Fasern; dünn myelinisiert: Gruppe III- bzw. A δ -Fasern) und unmyelinisierte Fasern (Gruppe IV- bzw. C-Fasern) eingeteilt. Zusätzlich erfolgte der Nachweis von marklosen efferenten sympathischen postganglionären Fasern (Langford & Schmidt, 1983; Hildebrand et al., 1991).

Dick myelinisierte Afferenzen (A β) mit verschiedenen korpuskulären Endigungen im Gelenk sind hauptsächlich „niederschwellig mechanosensitiv“ („low threshold units“), i.e. sie sind spezifisch auf mechanische Reize geringer Intensität, wie leichten Druck auf das Gelenk oder Bewegungen im Arbeitsbereich, empfindlich. Solche Reize lösen keine Schmerzen aus (Schaible & Schmidt, 1983a, b). Zusammen mit zahlreichen dünn myelinisierten und einigen unmyelinisierten Fasern dienen sie vorrangig der Propriozeption (Proske et al., 1988). Fasern der Gruppen III und IV hingegen terminieren als nicht-korpuskuläre „freie“ Nervenendigungen in Gelenkstrukturen wie Bändern, Menisci, dem Periost, der fibrösen Kapsel und dem Kapselfettgewebe (Klineberg, 1971; Halata et al., 1984; Heppelmann et al., 1990; Messlinger, 1996). Die meisten dieser Nervenfasern sind entweder nur durch potentiell gewebsschädigende Reize wie intensiven Druck oder Überdrehung des Gelenkes zu erregen („hochschwellig mechanosensitiv“ oder „high threshold units“) oder sie sind „mechanoinsensitiv“, i.e. sie sind unter normalen Umständen durch mechanische Reize überhaupt nicht erregbar (Schaible & Schmidt, 1983a, b). Letztere werden auch als „stumme“ oder „schlafende“ Nozizeptoren bezeichnet, denn sie werden erst bei einer entzündlichen Gewebeschädigung und der damit verbundenen Mediatorausschüttung aktiviert. Die hochschwelligen Afferenzen werden als nozizeptiv-spezifisch eingestuft, da sie nur bei Einwirkung schädigender Reize aktiviert werden.

Der nozizeptive afferente Einstrom aus dem Gelenk wird im Rückenmark von verschiedenen Typen von Neuronen bearbeitet. Ähnlich der Einteilung der peripheren Nozizeptoren können spinale Nervenzellen basierend auf ihren Antworteigenschaften auf schmerzhaft und nicht-schmerzhaft mechanische Reize zwei Gruppen zugeordnet werden. Nozizeptiv-spezifische, auch HT („high treshold“)-Neurone genannt, sind nur durch starke mechanische Stimuli aktivierbar und zeigen keine oder kaum Aktivität auf nicht-noxische Reizung des Gelenkes oder angrenzender tiefer Gewebsstrukturen. WDR („wide dynamic range“)-Neurone hingegen antworten schon auf nicht-noxische Reize wie leichten Druck oder Bewegungen im Arbeitsbereich des Gelenkes, wobei die Entladungsrate mit der Intensität der Reizung zunimmt. Die rezeptiven Felder der Rückenmarkneurone sind in der Regel nicht auf artikuläre Strukturen begrenzt, sondern wesentlich ausgedehnter. Neben Afferenzen aus dem Gelenk erhalten die Neurone auch afferenten Zustrom von der Muskulatur und in manchen Fällen von der Haut (Schaible et al., 1987b, 1991; Neugebauer & Schaible, 1990).

2.2. Entzündung und Plastizität des nozizeptiven Systems

Die Schädigung von Gewebe durch Trauma oder Entzündung ist mit einer Vielzahl von Reaktionen verbunden, die sich aus dem Zusammenspiel verschiedener zellulärer Elemente, nervaler und humoraler Faktoren ergeben. Im Mittelpunkt der Betrachtung sollen hier jedoch nur die komplexen Veränderungen stehen, die im nozizeptiven System stattfinden. Der Schmerz (Dolor) ist neben Rubor, Calor und Tumor eines der klassischen, von Celsus schon vor 2000 Jahren beschriebenen Symptome der Entzündung. So lösen während einer Entzündung selbst Reize geringer Intensität, wie z.B. leichte Berührung, im betroffenen Gebiet Schmerzen aus (Allodynie). Bei Einwirkung noxischer Reize tritt eine verstärkte Schmerzempfindung auf, und zwar nicht nur am Ort der Läsion (primäre Hyperalgesie), sondern auch im angrenzenden gesunden Gewebe (sekundäre Hyperalgesie, Hardy et al., 1950). Diese Phänomene sind bei Einwirkung kurzdauernder Schmerzreize unter normalen Bedingungen nicht zu beobachten. Sie beruhen zum einen auf einer erhöhten Erregbarkeit peripherer Nozizeptoren (Perl et al., 1976; Campbell & Meyer, 1983), zum anderen aber auch auf einer Sensibilisierung zentraler nozizeptiver Neurone (Basbaum & Wall, 1976; Dougherty & Willis, 1992; LaMotte et al., 1992; Torebjork et al., 1992) und sind als Reaktionen im Sinne einer funktionalen Plastizität des Nervensystems zu verstehen.

2.2.1. Periphere Sensibilisierung

Die Sensibilisierung nozizeptiver Primärafferenzen ist durch folgende Vorgänge gekennzeichnet (Schaible & Grubb, 1993):

- Absenkung der Erregungsschwelle von Nozizeptoren
- Zunahme der Aktionspotentialfrequenz bei überschwelligem Reizen
- Rekrutierung „schlafender“ Nozizeptoren
- Induktion von Ruheentladungen in Nozizeptoren

Grundlage dieser Prozesse sind Veränderungen des extrazellulären Milieus am Ort der Entzündung und Wechselwirkungen zwischen Mediatoren und neuronalen Strukturen. Nozizeptoren sind nicht nur sensibel für mechanische oder thermische Stimuli, sondern es gibt eine ganze Reihe körpereigener Substanzen, die in der Lage sind, Nozizeptoren unmittelbar zu aktivieren oder ihre Erregbarkeit zu beeinflussen. Zu dem „inflammatorischen Cocktail“, der infolge entzündlicher Stimuli in das Gewebe freigesetzt wird, gehören beispielsweise Wasserstoffionen, Adenosintriphosphat, Bradykinin, Histamin, Serotonin, Prostaglandine (insbesondere PGE₂ und PGI₂), Zytokine und Neurotrophine (Nerve Growth Factor). Sie bewirken nicht nur die Entzündungsentwicklung mit Rötung, Ödembildung und Überwärmung, sondern sie können auch zu einer Erregung und Sensibilisierung von Nozizeptoren führen. Letzteres wird vermittelt durch verschiedene Typen von Ionenkanälen und Membranrezeptoren, die an den sensorischen Endigungen von A δ - und C-Fasern exprimiert werden (McCleskey & Gold, 1999). Entzündungsmediatoren beeinflussen die Öffnungswahrscheinlichkeit von Ionenkanälen in der Nozizeptormembran entweder direkt (H⁺-Ionen, ATP, Serotonin) oder über, durch Interaktion mit metabotropen Membranrezeptoren ausgelöste, Second-messenger-Prozesse (Bradykinin, NGF) (Woolf & Salter, 2000). Durch die veränderte Ionenleitfähigkeit sinkt die Schwelle für die Erzeugung von Aktionspotentialen und die Anzahl der generierten Aktionspotentiale nimmt zu. Andererseits kann die Aktivierung der Rezeptoren auch zu einer verstärkten Transkription von Genen (z.B. für Neuropeptide, Membranrezeptoren und Enzyme) oder zur Aktivierung von Enzymen wie beispielsweise der Cyclooxygenase oder NO-Synthase führen.

Vor allem C-Fasern tragen durch efferente Wirkungen auf das Gewebe selbst zum Entzündungsvorgang und damit zur Schmerzhaftigkeit bei, indem sie Neuropeptide wie Calcitonin gene-related peptide (CGRP), Substanz P (SP), Neurokinin A (NKA) und andere Mediatoren wie z.B. Prostaglandine oder Stickoxid (NO) synthetisieren und bei Aktivierung aus ihren peripheren Endigungen in das Gewebe freisetzen. Diese Substanzen führen zu einer „neurogenen Entzündung“, i.e. sie verstärken die Dilatation (CGRP, NO) und Permeabilität

(SP, NKA) der Gefäßwände noch und tragen zur Anregung von Immunzellen, Degranulation von Mastzellen sowie der Sensibilisierung weiterer Nozizeptoren bei.

Zusammenfassend führt die Sensibilisierung peripherer Nozizeptoren zu einem qualitativ und quantitativ veränderten sensorischen Einstrom in das Rückenmark, der eine zeitliche und räumliche Bahnung an den zentralen Synapsen bewirkt.

2.2.2. Zentrale Sensibilisierung

Infolge einer peripheren Schädigung findet auch im Rückenmark ein Wandel in der Verarbeitung nozizeptiver Information statt. Dieser Prozeß wird zentrale Sensibilisierung genannt und resultiert in der Absenkung der Erregungsschwellen und Verstärkung der Antworten von Rückenmarkneuronen bei Reizung des entzündeten Gewebes, aber auch des benachbarten gesunden Gewebes. Das rezeptive Feld, i.e. das Areal in der Körperperipherie von dem aus ein Rückenmarkneuron aktiviert werden kann, vergrößert sich. Zusätzlich entwickelt ein Teil der zentralen sensorischen Neurone „Spontanaktivität“ (Schaible & Grubb, 1993).

Die zentrale Sensibilisierung ist auf prä- und postsynaptische Veränderungen in der synaptischen Übertragung zurückzuführen. Der erhöhte sensorische Einstrom aus der Peripherie infolge der gesteigerten Empfindlichkeit peripherer Nozizeptoren führt zu einer vermehrten Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren (Glutamat, Aspartat) und Neuropeptiden (SP, CGRP, NKA) aus den synaptischen Endigungen im Hinterhorn (Urban et al., 1994; Yang et al., 1996a). Diese können ligandengesteuerte Ionenkanäle und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in der postsynaptischen Membran aktivieren.

Intrazelluläre Ableitungen von Hinterhornneuronen der Ratte zeigen, daß die stärkere Aktivierung von primären Afferenzen zu einem schnell einsetzenden, kurz andauernden postsynaptischen Potential bewirkt (Li et al., 1999). Diese schnelle Komponente wird der Erregung von α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-Isoxazol (AMPA)-Rezeptoren durch Glutamat zugeschrieben und scheint bei der Übertragung nozizeptiver und nicht-nozizeptiver Informationen im Rückenmark v.a. auch unter physiologischen Bedingungen immanente Bedeutung zu besitzen (Handwerker, 1998). Andererseits werden durch die anhaltende Reizung von Nozizeptoren verstärkt CGRP, SP und NKA im Hinterhorn freigesetzt (Urban et al., 1994). Die Bindung dieser Neuropeptide an ihre jeweiligen Rezeptoren in der postsynaptischen Membran führt über Second-messenger-Prozesse zu langanhaltenden Depolarisationen in den Neuronen (Watkins & Evans, 1981). Dieser Umstand ist entscheidend für die Aktivierung von N-methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren durch

Glutamat. Die von diesem Rezeptortyp kontrollierten Ionenkanäle sind normalerweise durch ein Mg^{2+} -Ion blockiert. Erst wenn das Neuron durch andere synaptische Prozesse wie oben erwähnt nachhaltig depolarisiert wird, kann das kanalverschließende Mg^{2+} -Ion entfernt und der Kationenkanal v.a. für Ca^{2+} - und Na^{+} -Ionen geöffnet werden (Nowak et al., 1984; Ascher & Nowak, 1988). Die Eigenschaft der NMDA-Rezeptoren, mit zunehmender Depolarisation einen zunehmend größeren Kationenstrom zu bewirken, stellte sich als Grundlage eines schon 1965 von Mendell und Wall beobachteten Phänomens heraus (Woolf & Thompson, 1991; Szekely et al., 2002) - die elektrische Reizung von C-Fasern mit repetitiven Impulsen (ca. 1 Hz) erzeugt eine sehr viel stärkere postsynaptische Antwort in WDR-Neuronen als Einzelimpulse. Diese als „Wind up“ bezeichnete Antwortsteigerung hält nur einige Minuten an, die dabei auftretenden intrazellulären Vorgänge können jedoch Ausgangspunkt weiterer Sensibilisierungsvorgänge sein. Darüber hinaus kann die kurzzeitige hochfrequente Reizung (100 Hz) von C-Afferenzen eine Potenzierung der Erregung von Hinterhornneuronen hervorrufen, die viele Stunden anhält (LTP von „long term potentiation“) und ebenfalls von NMDA- und Neuropeptid-Rezeptoren abhängt (Liu & Sandkühler, 1995, 1997).

Im Zentrum der intrazellulären Vorgänge, die durch Aktivierung von NMDA- und Neuropeptid-Rezeptoren induziert werden, steht die Erhöhung des freien Kalziums in der Zelle und die Aktivierung von Proteinkinasen (PKA und C). Die Folge ist einerseits ein weniger negatives Membranpotential und damit eine größere Wirksamkeit von erregendem synaptischen Input. Andererseits werden durch Phosphorylierung Enzyme aktiviert bzw. die Expression von Genen induziert und damit die Bildung weiterer Mediatoren, wie NO oder Prostaglandine angeregt. Zudem findet unter entzündlichen Bedingungen ein Wandel der Rezeptorsensibilität und -expression an prä- und postsynaptischen Membranen statt. Die beschriebenen Veränderungen im Zellstoffwechsel während der zentralen Sensibilisierung führen zu einer andauernden Verstärkung und Erleichterung der synaptischen Informationsübertragung (Svensson & Yaksh, 2002).

2.3. Cyclooxygenasen, Prostaglandine und NSAIDs

Nichtsteroidale anti-inflammatorische Analgetika (NSAIDs) sind seit langem im Gebrauch zur Behandlung von leichten bis mittelschweren Schmerzen nach Traumen und kleineren operativen Eingriffen sowie zur Linderung chronischer Schmerzzustände, z.B. bei Arthritis (Bensen et al., 1999) und Tumorleiden (Foley & Inturrisi, 1987). Sie sind momentan die Klasse der am weitverbreitetsten Analgetika.

Die Mechanismen, über die NSAIDs analgetisch wirken, sind Gegenstand intensiver Forschung. Grundlage der heute geltenden Auffassung über die wesentliche Wirkungsweise dieser Substanzgruppe bildet der von Vane und anderen in der frühen 1970er Jahren postulierte Mechanismus der Cyclooxygenase (COX)-Hemmung und damit der verminderten Prostaglandinentstehung (Smith, JB & Willis, 1971; Vane, 1971; Ferreira, 1972; Ferreira et al., 1973).

2.3.1. Vorkommen und Funktionen der COX-Isoformen

Das Enzym COX ist ein im Körper ubiquitär vorkommendes, membranständiges Protein, das die aus Membranphospholipiden freigesetzte Arachidonsäure in Prostaglandin (PG) G_2 und H_2 umwandelt. Die weitere Modifikation von PGH_2 durch zellspezifische Enzyme wie verschiedene Isomerasen, Prostacyclin- und Thromboxan-Synthase führt dann zu den Prostanoiden, i.e. den funktionellen Prostaglandinen D_2 , E_2 , $F_{2\alpha}$, I_2 , und Thromboxan A_2 (TxA_2). Bislang wird angenommen, daß Prostanoiden nicht gespeichert, sondern bei Aktivierung der Zellen durch verschiedenste Stimuli jeweils de novo synthetisiert werden (Funk, 2001). Als autokrine oder parakrine Lipidmediatoren mit Halbwertszeiten im Bereich von Sekunden bis Minuten sind Prostanoiden an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen beteiligt.

Bislang wurden drei Cyclooxygenase-Subtypen – COX-1, -2 und -3 – nachgewiesen, die sich nach Vorkommen und Expressionsmuster unterscheiden. Die COX-3 ist im ZNS vorhanden (Chandrasekharan et al., 2002), aber über ihre Funktion ist wenig bekannt, so daß sie hier nicht weiter Beachtung finden soll. Die COX-1 wird in nahezu allen Organsystemen konstitutiv exprimiert, vor allem in Magen, Niere, Milz, Thrombozyten, Lunge und im Gefäßendothel (Crofford, 1997; Tegeder et al., 2000). Als „house keeping enzyme“ induziert sie multiple physiologische Effekte im gesunden Gewebe und ihre Produkte haben wichtigen Einfluß auf die Homöostaseregulation. So ist PGE_2 beispielsweise an der Aufrechterhaltung

der Integrität der Magenschleimhaut und der normalen Nierenfunktion beteiligt. TxA_2 und PGI_2 fungieren als Gegenspieler bei der Plättchenaggregation und der Regulation der Gefäßweite.

Dagegen hat die COX-2 eine komplexe Funktion: einerseits wird sie durch physiologische Adaptationsvorgänge, wie z.B. bei der Weheninduktion, Nierendurchblutung oder Wundheilung exprimiert. Andererseits spielt sie bei der Entstehung und Unterhaltung von Schmerzen, Fieber und entzündlichen Reaktionen eine wesentliche Rolle.

Beide Isoformen haben ein Molekulargewicht von 71 kDa und sind sich in Struktur und katalytischer Aktivität sehr ähnlich. Ihre Gene sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert – das größere COX-1-Gen auf Chromosom 9 und das kleinere „immediate early genes“ der COX-2 auf Chromosom 1 (Otto & Smith, 1994, 1995). „Immediate early genes“ sind Gene, die rasch und vorübergehend aktiviert werden, wenn eine Zelle nachhaltig stimuliert wird. Die Promotorregion des COX-2-Gens enthält im Gegensatz zum COX-1-Gen eine TATA-Sequenz und weitere Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen die für Entzündungsmediatoren, Hormone, Wachstumsfaktoren, cAMP u.a. sensibel sind – dies erklärt wenigstens teilweise die rapide Induzierbarkeit der COX-2 (Hoff et al., 1993; Smith CJ et al., 1993; Murakami et al., 1994). Abbildung 1 faßt die unterschiedlichen Funktionen der COX-Isoenzyme nochmals zusammen.

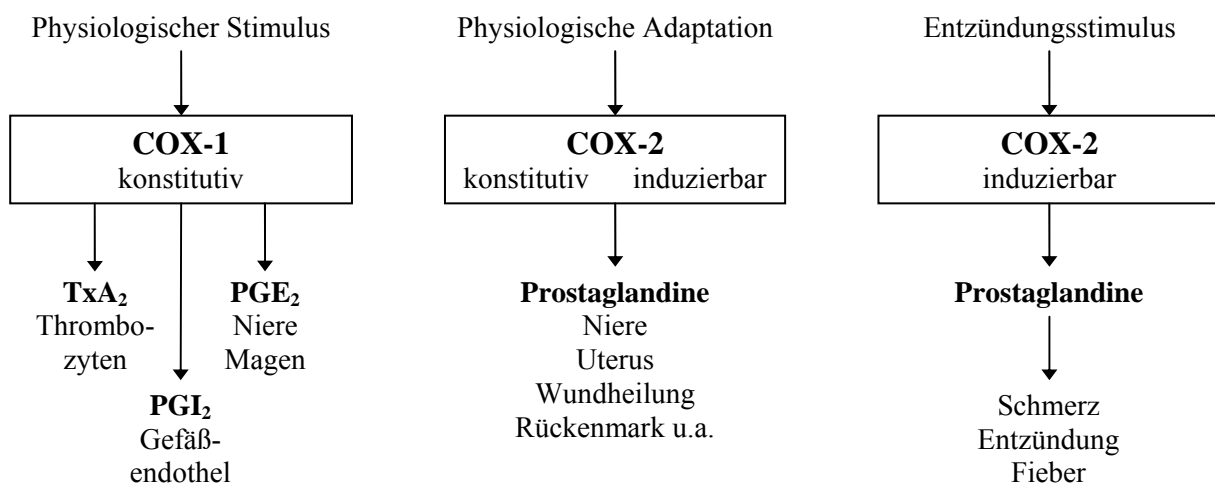


Abbildung 1: Isoformen der Cyclooxygenase (modifiziert nach Burian & Geisslinger, 2003)

2.3.2. Veränderungen im COX-Prostaglandin-System während entzündlicher Vorgänge und ihr Einfluß auf das periphere nozizeptive System

In entzündlich oder traumatisch geschädigtem Gewebe erfolgt eine starke Induktion der COX-2 (Sano et al., 1992; Masferrer et al., 1994; Seibert et al., 1994; Appleton et al., 1995; Moore et al., 1995; Anderson et al., 1996; Katori et al., 1998; Nantel et al., 1999). Dieser COX-2-Anstieg ist nicht nur während akuter Entzündungen, sondern auch bei chronisch-entzündlichen Verläufen wie der rheumatoiden Arthritis und Osteoarthritis nachweisbar. Beispielsweise konnte in Makrophagen, Monozyten, Endothelzellen, Chondrozyten und Osteoblasten sowie im Synovialgewebe arthritischer Gelenke von Nagern und Menschen eine erhöhte COX-2 Expression festgestellt werden (Sano et al., 1992; Crofford et al., 1994; Anderson et al., 1996). Die COX-1 wird im Entzündungsgebiet hingegen nur geringfügig induziert. Die Stimulation der COX-2-Expression erfolgt durch verschiedene in das Entzündungsgebiet freigesetzte Faktoren, wie Zytokine (Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-1 u.a.), Mitogene und Wachstumsfaktoren (Jones et al., 1993; Needleman & Isakson, 1997). Antiinflammatorische Zytokine wie IL-4 und IL-13 sowie die immunsuppressiven Glukokortikoide können auf der anderen Seite der COX-2-Expression entgegenwirken (Crofford, 1997).

Letztendlich führt die starke Induktion der COX-2 im entzündeten Gewebe zu einer überschießenden lokalen Produktion von Prostaglandinen (Katori et al., 1998; Nantel et al., 1999), die zur Ausprägung der typischen Entzündungssymptome und zur Sensibilisierung nozizeptiver Afferenzen beitragen. Eine Vielzahl von Studien belegt mit unterschiedlichen Methoden, daß insbesondere PGE₂ und PGI₂ die Erregungsschwelle peripherer nozizeptiver Afferenzen für thermische (Handwerker, 1976; Taiwo & Levine, 1990; Mizumura et al., 1991), mechanische (Schaible & Schmidt, 1988a, b; Birrell et al., 1991; Kress et al., 1992; Schepelmann et al., 1992) und chemische Stimuli (Handwerker, 1976; Mense, 1981; Schepelmann et al., 1992; Birrell et al., 1993; Stucky et al., 1996) senken können. Prostaglandine wirken an verschiedenen Typen von Membranrezeptoren, die über G-Proteine Second-messenger-Prozesse steuern. Die daraus resultierende Veränderung der Erregbarkeit zeigt sich in einer Absenkung der Erregungsschwelle sowie einem Anstieg der Entladungsrate auf Reizung. Außerdem setzten die durch Prostaglandine sensibilisierten Nozizeptoren verstärkt proinflammatorische Peptide (z.B. Substanz P und CGRP) in das Entzündungsgebiet frei (Hua et al., 1994).

In den letzten Jahren wurde allerdings bekannt, daß Prostaglandine nicht nur für die periphere Sensibilisierung von großer Bedeutung sind, sondern daß sie auch bei der zentralen Sensibilisierung eine Rolle spielen können. In den folgenden Abschnitten soll genauer dargestellt werden, welche Veränderungen des COX-Prostaglandin-Systems im Rückenmark infolge einer peripheren Schädigung stattfinden.

2.3.3. Lokalisation und Regulation der Cyclooxygenasen im Rückenmark

Im Gegensatz zu peripheren Geweben werden COX-1 und COX-2 auf spinaler Ebene konstitutiv exprimiert. In Rückenmark-Homogenaten ist sowohl COX-1 mRNA (Beiche et al., 1996, 1998a; Hay & de Belleruche, 1997; Hay et al., 1997; Tonai et al., 1999; Gühring et al., 2000) als auch COX-2 mRNA (Beiche et al., 1996, 1998a; Hay et al., 1997; Hay & de Belleruche, 1997, 1998; Tonai et al., 1999; Gühring et al., 2000) unter basalen Bedingungen vorhanden. Mehrere Arbeitsgruppen belegen außerdem die Anwesenheit von COX-1- (Goppelt-Strube & Beiche, 1997; Willingale et al., 1997; Beiche et al., 1998a; Resnick et al., 1998; Ebersberger et al., 1999; Yaksh et al., 2001) und COX-2-Protein (Willingale et al., 1997; Beiche et al., 1998a, b; Resnick et al., 1998; Ebersberger et al., 1999; Yaksh et al., 2001) im Rückenmark.

Die Verteilung der COX-Isoenzyme auf zellulärer Ebene kann mit immunhistochemischen Verfahren und In situ-Hybridisation genauer untersucht werden. COX-2-Immunreaktivität (COX-2-li) ist in Neuronen aller Laminae, v.a. aber in den Laminae I-II, V-VI und X, sowie in Motoneuronen des Vorderhornes nachweisbar. Besonders starke COX-2-li zeigt das Zytoplasma der perinukleären Region und die Kernmembran dieser Neurone. Geringer ausgeprägt ist das Enzym auch in der Nissl-Granula und anderen zytoplasmatischen Regionen vorhanden (Goppelt-Strube & Beiche, 1997; Willingale et al., 1997; Beiche et al., 1998b; Ghilardi et al., 2004). COX-2 konnte in 70% der Zellen gefunden werden, die auch den NK-1-Rezeptor für Substanz P exprimieren (Ghilardi et al., 2004). Nichtneuronale Elemente wie Gliazellen enthalten ebenfalls COX-2, v.a. in der weißen Substanz (Beiche et al., 1998b; Maihofner et al., 2000; Ghilardi et al., 2004). Unter normalen Bedingungen konnte COX-1-li dagegen nur in Gliazellen des Vorder- und Hinterhornes, nicht jedoch in Neuronen nachgewiesen werden (Maihofner et al., 2000). In den Spinalganglien ist hingegen starke COX-1-Immunreaktivität vorhanden, besonders konzentriert im Zytoplasma, in der Kernmembran und in den axonalen Fortsätzen kleiner und mittelgroßer Neurone ($<1000\text{ }\mu\text{m}^2$) sowie im Zytoplasma von Gliazellen (Willingale et al., 1997). In vielen dieser Neurone treten CGRP (Chopra et al., 2000) und SP (Lawson et al., 1993) co-lokalisiert mit COX-1 auf, sie

werden aufgrund dessen als nozizeptive Neurone klassifiziert. Willingale und Chopra et al. wiesen in den Spinalganglien keine COX-2-positiven Zellen nach. In vitro detektierten Inoue et al. in kultivierten Spinalganglienzellen allerdings sowohl COX-1- als auch, wenngleich in geringerem Ausmaß, COX-2 mRNA (Inoue et al., 1999). Unklar bleibt, welche Funktion die COX und ihre Produkte unter normalen Bedingungen für die neuronale Transmission haben. Die basale Ausschüttung von Prostaglandinen scheint nicht zur Effektivität der synaptischen Übertragung von nozizeptiven Informationen aus gesundem Gewebe beizutragen, denn nach intrathekaler Applikation von COX-Hemmern tritt keine Veränderung von nozizeptivem Verhalten (Malmberg & Yaksh, 1992a; Yamamoto & Nozaki-Taguchi, 1996, 1997) und keine Senkung der Aktivität nozizeptiver Neurone (Willingale et al., 1997) ein.

Die Applikation unterschiedlicher experimenteller entzündlicher und traumatischer Stimuli zeigt, daß im Rückenmark vor allem die COX-2 als Reaktion auf eine periphere Schädigung verstärkt gebildet wird. Eine Zunahme der COX-1-Expression ist dagegen im allgemeinen nicht (Beiche et al., 1996, 1998a; Hay et al., 1997; Hay & de Belleruche, 1998; Seybold et al., 2003) oder nur geringfügig (Tonai et al., 1999; Gühring et al., 2000) nachweisbar. Beispielsweise führt die subkutane Injektion von Carrageenan (Hay & de Belleruche, 1997), Zymosan (Gühring et al., 2000) oder Freund-Adjuvans (CFA; Beiche et al., 1996, 1998a; Hay et al., 1997) zu einer Induktion von spinaler COX-2 mRNA. Dieser Anstieg geht einher mit der Entwicklung von Hyperalgesie und Ödem in der Peripherie und ist begleitet von einer deutlichen Erhöhung von COX-2-Protein im Rückenmark (Seybold et al., 2003). Auch die Injektion von Kaolin und Carrageenan in das Kniegelenk der Ratte (Ebersberger et al., 1999) sowie traumatische Rückenmarkschädigung (Resnick et al., 1998) führen zu einer vermehrten Expression von COX-2-Protein. Die verstärkte COX-2-Expression kann in neuronalen (Maihofner et al., 2000) und nicht-neuronalen Elementen, wie Astrozyten, Mikroglia und Endothelzellen (Bauer et al., 1997; Hirst et al., 1999; Ibuki et al., 2003) beobachtet werden. Die Induktion der COX ist dabei nicht auf Segmente, die synaptischen Einstrom aus dem entzündeten Gebiet erhalten, beschränkt, sondern auch auf der kontralateralen Seite und in entfernten Rückenmarkregionen, sowie im Thalamus nachweisbar (Beiche et al., 1996, 1998a; Hay et al., 1997). Interessanterweise stimuliert die intrathekale Applikation von IL-1 α (Tonai et al., 1999) und IL-1 β (Samad et al., 2001) ebenfalls die Expression von COX-2 mRNA und kann zudem eine mechanische Hyperalgesie hervorrufen (Reeve et al., 2000). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Induktion der COX-2 infolge einer Gewebsläsion durch einen Anstieg des afferenten Einstromes und durch die Erhöhung zirkulierender proinflammatorischer Faktoren verursacht wird.

2.3.4. Spinale Prostaglandine

Prostaglandine sind lokale Mediatoren mit einer Vielzahl von Funktionen in peripheren Geweben als auch im ZNS. Mehrere Arbeiten haben gezeigt, daß spinale Prostaglandine, insbesondere PGE_2 , bei der Entstehung von Schmerz und zentraler Sensibilisierung eine wichtige Rolle spielen können (Vanegas & Schaible, 2001). Diese Annahme basiert hauptsächlich auf der Beobachtung, daß sie die Erregbarkeit spinaler Neurone verstärken und auf der anderen Seite die Blockade der COX durch NSAIDs Hyperalgesie-assoziiertes nozizeptives Verhalten abschwächt (Svensson & Yaksh, 2002).

PGD_2 , E_2 , $\text{F}_{2\alpha}$ und I_2 sind auch unter nicht-entzündlichen Bedingungen im Liquor von Ratten nachweisbar (Coderre et al., 1990; Malmberg & Yaksh, 1995a, b; Yang et al., 1996a, b; Ebersberger et al., 1997; Willingale et al., 1997; Hua et al., 1999). Ein starker Anstieg der PGE_2 -Ausschüttung kann nach noxischer Reizung von C-Fasern z.B. durch elektrische Pulse (Ramwell & Shaw, 1966), noxische Hitze (Coderre et al., 1990), subkutanen Formalin (Malmberg & Yaksh, 1995a, b; Hua et al., 1999; Muth-Selbach et al., 1999; Geisslinger et al., 2000) oder nach Induktion einer peripheren Entzündung (Yang et al., 1996a; Hay & de Belleruche, 1997, 1998; Ebersberger et al., 1999; Gühring et al., 2000; Ibuki et al., 2003) in Mikrodialysaten gemessen werden. Gleichfalls führt die intrathekale Applikation von NMDA (Koetzner et al., 2004) oder Substanz P (Hua et al., 1999) zu einer gesteigerten PGE_2 -Freisetzung, was belegt, daß die gesteigerte Freisetzung von Glutamat und die spinale Aktivierung von NMDA-Rezeptoren Mechanismen darstellen, die zu einer verstärkten Bildung von COX-Produkten führen.

Andererseits erzeugt die intrathekale Applikation von PGE_2 in wachen Tieren Allodynie, mechanische und thermische Hyperalgesie (Taiwo & Levine, 1988; Uda et al., 1990; Minami et al., 1992, 1994a, b, 1996; Malmberg & Yaksh, 1995a, b; Nishihara et al., 1995; Ferreira & Lorenzetti, 1996; Park et al., 2000; Turnbach et al., 2002). PGD_2 ruft hauptsächlich Hyperalgesie (Uda et al., 1990) hervor, $\text{PGF}_{2\alpha}$ hingegen Allodynie (Minami et al., 1992). Aus elektrophysiologischen Untersuchungen, i.e. direkter Ableitung der Aktivität von Hinterhornneuronen, sind ähnliche Ergebnisse wie aus den Verhaltensexperimenten bekannt. So konnte nach spinaler Applikation von PGE_2 ein Anstieg der Antworten nozizeptiver Hinterhornneurone auf nicht-noxische und noxische mechanische Reizung von Gelenken (Vasquez et al., 2001) und Haut (Turnbach et al., 2002) beobachtet werden. Ähnliche Effekte sind durch lokale Applikation von PGE_2 -Rezeptor-Agonisten (EP1/-2/-4 -Agonisten) auslösbar (Bär et al., 2004). Durch die direkte Applikation von PGE_2 auf das Rückenmark

können also Veränderungen im Antwortverhalten der Hinterhornneurone simuliert werden, wie sie während der Entstehung einer Entzündung in der Peripherie auftreten (Woolf, 1983; Neugebauer & Schaible, 1990; Dougherty et al., 1992; Vasquez et al., 2001).

Die Effekte von Prostaglandinen werden durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt, deren Vorkommen und Verteilung auf spinaler Ebene besonders für die PGE₂-Rezeptoren EP1 – EP4 untersucht wurde. Diese sind unterschiedlich lokalisiert – die Rezeptor-Subtypen EP1, EP3, EP4, IP in den Primärafferenzen, EP2 und DP hingegen in der Zellmembran postsynaptischer Neurone (Sugimoto et al., 1994; Oida et al., 1995; Kawamura et al., 1997; Beiche et al., 1998b). Im Verlauf einer Entzündung unterliegt die Expression der Prostaglandin-Rezeptoren diversen Veränderungen, der Einfluß dieser Mechanismen auf die Schmerzverarbeitung ist jedoch noch unklar (Donaldson et al., 2001).

Die Aktivierung der einzelnen Subtypen scheint in unterschiedlichem Ausmaß zur Entstehung von Hyperalgesie und Allodynie beizutragen (Minami et al., 1994a). Als möglicher Mechanismus auf molekularer Ebene wird diskutiert, daß Prostaglandin-Bindung an diese Rezeptoren über Second-messenger-Systeme (Veränderung des Ca²⁺-, cAMP-, Phosphoinositol-Gehaltes der Zellen) unter anderem eine Aktivierung der Proteinkinase A bewirkt. Dieses Enzym phosphoryliert Membrankanäle und kann zu einer Änderung des Öffnungsverhaltens dieser Kanäle. So wird in den präsynaptischen Endigungen, wie Untersuchungen an Hinterhornganglienzellen in Kultur vermuten lassen, z.B. durch PGE₂ der Ca²⁺-Einstrom in die Zelle verstärkt (Nicol et al., 1992), die Aktivierung Tetrodotoxin-resistenter, spannungsgesteuerter Na⁺-Kanäle erleichtert (Gold et al., 1996, 1998) oder durch PGI₂ und PGE₂ spannungsgesteuerte K⁺-Kanäle (Nicol et al., 1997) gehemmt. Auf diese Weise senken Prostaglandine die Erregungsschwelle und erhöhen die Anzahl der generierten Aktionspotentiale pro Stimulus in den Primärafferenzen. Verschiedene Befunde deuten darauf hin, daß Prostaglandine im Zuge dieser Veränderungen zu einer verstärkten Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren (Glutamat und Aspartat), Substanz P, CGRP und NO (Nicol et al., 1992; Hingtgen et al., 1995; Vasko, 1995; Sakai et al., 1998) aus den präsynaptischen Endigungen beitragen. Eine direkte exzitatorische Wirkung von Prostaglandinen an postsynaptischen Membranen im Hinterhorn muß ebenfalls angenommen werden. Mittels „patch clamp“-Technik und intrazellulärer Ableitung zeigten Baba et al. in vitro an Rückenmarkscheiben („slice“-Präparate), daß PGE₂ einwärtsgerichtete Ströme hervorruft bzw. Neurone im tiefen Hinterhorn depolarisieren kann. PGF_{2α} bzw. D₂ lösten keine entsprechenden Reaktionen aus (Baba et al., 2001).

2.3.5. Zentrale Wirkmechanismen von COX-Inhibitoren

Seit der Einführung der nicht-steroidalen antiinflammatorischen Analgetika wird vermutet, daß NSAIDs neben dem Angriffsort in der Peripherie auch eine zentrale Wirkkomponente besitzen (McCormack & Brune, 1991). Tatsächlich konnten mehrere Arbeitsgruppen in den letzten Jahren zeigen, daß die direkte Applikation von COX-Inhibitoren auf spinale Strukturen die Prostaglandinsynthese im Rückenmark hemmt bzw. Antinozizeption erzeugt. 1992 wiesen Malmberg und Yaksh darauf hin, daß die intrathekale Injektion von NSAIDs die durch Aktivierung von spinalen Glutamat- und Substanz P-Rezeptoren vermittelte thermische Hyperalgesie vermindert (Malmberg & Yaksh, 1992b). In weiteren Studien konnte durch die spinale Applikation von nicht-selektiven COX-Inhibitoren wie z.B. Indometacin, Ibuprofen oder selektiven COX-2-Hemmern wie Celecoxib, NS-398, SC-58125, SC-384, SC-236 vor Induktion einer peripheren Entzündung Formalin-induziertes nozizeptives Verhalten (Malmberg & Yaksh, 1992a, 1995a; Yamamoto & Nozaki-Taguchi, 1996, 2002), sowie die Entwicklung von thermischer (Dirig et al., 1998; Gühring et al., 2000; Yaksh et al., 2001) und mechanischer (Vasquez et al., 2001) Hyperalgesie nach Carrageenan- oder Zymosan-Injektion dosisabhängig verhindert werden. Der selektive COX-1-Hemmer SC-560 zeigte hingegen in den genannten Modellen keinen Effekt (Yaksh et al., 2001; Yamamoto & Nozaki-Taguchi, 2002). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Induktion der COX-2 und die erhöhte Prostaglandinbildung im Rückenmark zur Entstehung entzündungsinduzierter spinaler Hyperexzitabilität beitragen.

Nur wenige Studien beschäftigen sich jedoch bisher mit der Frage, welchen Einfluß die Hemmung der COX im Rückenmark bei bestehender zentraler Sensibilisierung hat. Zudem sind die veröffentlichten Ergebnisse äußerst konträr.

Beispielsweise konnte die therapeutische Behandlung mit intrathekalem Ibuprofen und SC-58125 2 h nach Carrageenan-Injektion in die Pfote die entstandene thermische Hyperalgesie nicht abschwächen. Dies gelang nur durch die systemische Applikation (Dirig et al., 1998). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die belegen, daß selektive COX-2 Hemmer wie NS-398 oder Dinoprostin bei intrathekalen Gabe 2 h nach Carrageenan-Injektion die entstandene thermale Hyperalgesie stark abschwächen (Yamamoto & Nozaki-Taguchi, 1997; Ibuki et al., 2003). Die subkutane Injektion von Zymosan erzeugt eine robuste Entzündung mit starker Schwellung sowie mechanischer und thermische Hyperalgesie. Intrathekale Administration von Indometacin 4 h nach Zymosan konnte die mechanische, nicht jedoch die thermische Hyperalgesie oder das Ödem reduzieren (Turnbach & Randich, 2001).

Neben den Ergebnissen aus Verhaltensexperimenten gibt es auch direkte Evidenz aus elektrophysiologischen Untersuchungen, daß COX-Hemmer die Erregbarkeit von Neuronen auf spinaler Ebene beeinflussen. Der nozizeptive Flexor-Reflex als Antwort auf die elektrische Reizung des Nervus suralis ist nach CFA-Injektion in die Pfote als Ausdruck der entstehenden Hyperalgesie verstärkt. Ibuprofen, 2-3 Tage nach Induktion der Entzündung intrathekal verabreicht, konnte die Ausprägung der Reflexantwort dosisabhängig reduzieren (Seybold et al., 2003). Vasquez et al. zeigten 2001 am Modell der akuten Arthritis durch Kaolin/Carrageenan-Injektion, daß die spinale Applikation des nicht-selektiven COX-Inhibitors Indometacin vor und in den ersten 6-8 h nach Entzündungserzeugung die Entwicklung spinaler Hyperexzitabilität abschwächt, auf die peripheren Entzündungszeichen allerdings keinen Einfluß hat. Nach 6-11 h bei vollständig entwickelter spinaler Übererregbarkeit konnte hingegen nur die systemische, nicht aber die spinale Gabe von Indometacin die Antworten nozizeptiver Hinterhornneurone auf mechanische Reize senken. Die aus diesen Beobachtungen abgeleitete Hypothese beinhaltet, daß die spinale Prostaglandinproduktion zur Induktion zentraler Sensibilisierung beiträgt, an ihrer Aufrechterhaltung jedoch nicht beteiligt ist.

2.4. Ziel der Arbeit

Die Ergebnisse der in den letzten Abschnitten dargestellten Studien deuten darauf hin, daß Veränderungen in der spinalen Expression der COX-Isoenzyme und somit der Prostaglandinbildung an der Entstehung zentraler Hyperexzitabilität beteiligt sind. Der Stellenwert von COX-1 bzw. COX-2 ist dabei nicht vollständig verstanden. Nicht geklärt ist außerdem die Frage, welche Rolle die COX-Isoenzyme bei der Aufrechterhaltung dieses sensibilisierten Zustandes spielen. Obwohl in verschiedenen Verhaltensstudien gezeigt werden konnte, daß spinale Prostaglandine auch für die Aufrechterhaltung der Übererregbarkeit von Rückenmarkneuronen von Bedeutung sind, gibt es doch wenig direkten elektrophysiologischen Beweis, daß COX-Hemmer die neuronale Erregbarkeit im Rückenmark beeinflussen können, wenn durch einen peripheren entzündlichen Stimulus einmal eine Sensibilisierung stattgefunden hat.

Daher sollten in der vorliegenden Arbeit am Modell der Kaolin/Carrageenan-induzierten akuten Arthritis bei der Ratte die Auswirkungen der spinalen Hemmung von COX-1 und COX-2 auf die Schmerzverarbeitung im Rückenmark in verschiedenen Entzündungsstadien analysiert werden. Mittels extrazellulärer Ableitung wurden Veränderungen im Antwortverhalten von Hinterhornneuronen mit nozizeptivem Eingang aus dem Knie auf mechanische Reize nicht- noxischer und noxischer Intensität unter Einwirkung einer Reihe von Hemmstoffen der COX registriert. Im einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Verändert die spinale Applikation von L-745,337 (selektiver COX-2-Inhibitor) bzw. SC-560 (selektiver COX-1-Inhibitor) die Antworten nozizeptiver Hinterhornneurone auf mechanische Reize im normalen Tier?
- Welchen Einfluß hat die selektive Hemmung der spinalen COX-Isoenzyme durch L-745,337 bzw. SC-560 auf die Entwicklung entzündungsinduzierter Übererregbarkeit spinaler Neurone?
- Reduziert die spinale Applikation von COX-Inhibitoren die neuronalen Reizantworten bei bestehender zentraler Sensibilisierung bzw. gibt es einen Unterschied in der Wirksamkeit selektiver und nicht-selektiver COX-Hemmstoffe?
- Welchen Effekt hat die systemische Applikation von L-745,337 und SC-560 auf das Antwortverhalten nozizeptiver Hinterhornneurone bei etablierter Hyperexzitabilität? Läßt sich daraus eine Aussage über den Stellenwert spinaler und extraspinaler Angriffsorte für den analgetischen Effekt dieser selektiven COX-Hemmer ableiten?

Durch die Beantwortung dieser Fragestellungen lassen sich möglicherweise Erkenntnisse gewinnen, die einerseits zum besseren Verständnis der Pathogenese von Schmerzen infolge entzündlicher Prozesse und andererseits zur Aufklärung der Wirkmechanismen von COX-Inhibitoren beitragen. Auf deren Grundlage könnten neue therapeutische Optionen entwickelt bzw. bestehende Therapiekonzepte optimiert werden.

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Extrazelluläre Ableitung

Aktionspotentiale an der Membran von Nervenzellen erzeugen einen elektrischen Stromfluß im Extrazellulärraum. Die Spannung dieser Potentiale kann mit extrazellulären Elektroden aufgezeichnet werden. Ein Aktionspotential liefert dabei eine typische Form, die als „Spike“ (Abb. 2) bezeichnet wird.

In den späten 1970er Jahren wurden Carbonfaserelektroden für die Messung von

Strömen in der extrazellulären Lösung nahe der Nervenzellmembran entwickelt. Gegenüber herkömmlichen, offenen Glaselektroden haben sie den entscheidenden Vorteil beim Einstechen in das Gewebe nicht verstopfen zu können. Carbonfaserelektroden zeichnen sich durch konstante Impedanz und geringen Signalverlust aus. Die Ableitung der Aktivität von Nervenzellen ist somit über einen langen Zeitverlauf möglich. Bei den herkömmlichen Glaselektroden hingegen steigt durch die Ansammlung von Zellmaterial in der Elektrodenspitze der Widerstand und das abgeleitete Signal wird schwächer.

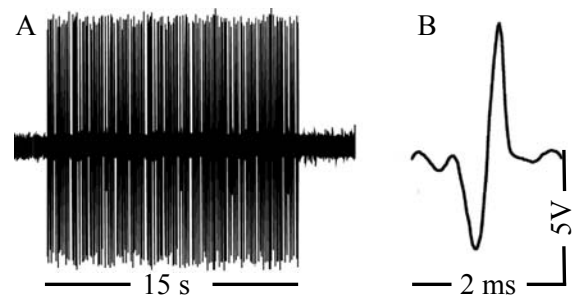


Abbildung 2: neuronale Antwort auf noxische Reizung des Knies. Darstellung der Spikes mit dem digitalen Oszilloskop (A) und mit der Software SPIKE/SPIDI (B)

3.1.1. Herstellung der Elektroden

Die Ableitung der extrazellulären Potentiale erfolgte unter Verwendung von glasisolierten Carbonfaserelektroden mit einem Widerstand von 10-15 MΩ. Zunächst wurde je eine Carbonfaser mittels Silberleitlack mit einem Silberdraht verbunden, an dessen Ende ein Goldstecker gelötet war. Zur Isolation wurde die Carbonfaser dann in eine Glaskapillare (Borosilikatglas, Typ 1103244, Hilgenberg, Malsfeld) eingebracht und Röhrchen und Goldstecker mit handelsüblichem Zweikomponentenkleber verbunden. Mit einem Elektrodenziehgerät (Modell von Narashige, Tokyo) konnten aus diesen Rohlingen Elektroden mit einem Spitzendurchmesser von ca. 5 µm gefertigt werden. Das Glas wurde hierbei geschmolzen und mit Hilfe eines Elektromagneten auseinander gezogen. Um

Elektroden mit optimalem Widerstand (10-15 M Ω) herzustellen, wurde das überstehende Ende der Carbonfaser unter mikroskopischer Sicht mit einer angelegten Spannung von 25-35 V in einer mit Kaliumdichromat angereicherten 0,1 M Schwefelsäure-Lösung abgeätzt.

3.1.2. Registrierung und Verarbeitung neuronaler Aktivität

Ein Vorverstärker (in Abb. 3 nicht dargestellt) in unmittelbarer Nähe der Ableitelektrode, mit der Spannungsverläufe in der extrazellulären Lösung nahe der Nervenzellmembran registriert wurden, hielt den Verlust von Signalen gering. Als indifferente Elektrode diente eine zwischen Haut und Abdominalwand eingeschobene Silber-Silberchloridelektrode (WPI, New Heaven, USA). Durch einen Differentialverstärker (DAM 80, WPI) wurden die Signale zunächst um das 10000-fache amplifiziert und dann zu einem regelbaren Verstärker weitergeleitet. Mit diesem konnte die Größe der Aktionspotentiale fein reguliert und gleichzeitig an nachgeschaltete Geräte zur Visualisierung und Aufzeichnung weitergegeben werden. Zwischengeschaltete Hoch- und Tieffrequenzfilter ermöglichten die Auswahl der für die Ableitung der Aktionspotentiale wesentlichen Frequenzen zwischen 0,3 und 3 kHz. Mit einem Fensterdiskriminator erfolgte die Eingrenzung auf Aktionspotentiale mit ausreichender Amplitudengröße und somit die getrennte Darstellung der Aktivität eines Neurons vom Grundrauschen. Abbildung 3 veranschaulicht das Schaltbild des Meßstandes.

Die verstärkten, aber ungefilterten und ungefensterten Rohsignale konnten mittels der SPIKE-Software (Version 2.9., 09/2001, Forster und Handwerker, Erlangen) mit einem PC dargestellt und aufgezeichnet werden, um sie später der endgültigen Auswertung (Selektion nach Größe und Form, Auszählung eines auf 15 s definierten Zeitfensters) zu unterziehen.

Signale, die Frequenzfilter und Fensterdiskriminator passiert hatten, wurden über ein zwischengeschaltetes Interface (CED 1401, Science Park, Cambridge, England) in einen weiteren Computer (M24, Olivetti, Navara, Italien) eingespeist, der über das Programm M-RATE Peristimulus-Zeit-Histogramme darstellte und speicherte. Dies diente der Kontrolle der Aufnahme über die gesamte Versuchsdauer sowie der Erstellung einer Sicherheitskopie für die spätere offline-Auswertung der Daten.

Zur online-Kontrolle während des Experimentes wurden die gefilterten und gefensterten Signale außerdem akustisch durch Lautsprecher, visuell auf einem analogen (HM 305-2, Hameg Instruments, Frankfurt) und einem digitalen (Classic 6000, Gould, Eastlake, USA) Oszilloskop dargestellt. Nach jeder Reizung wurde die Anzahl der Aktionspotentiale an letzterem abgelesen und im Protokoll als Hilfestellung und zur Kontrolle der späteren offline-Auswertung notiert.

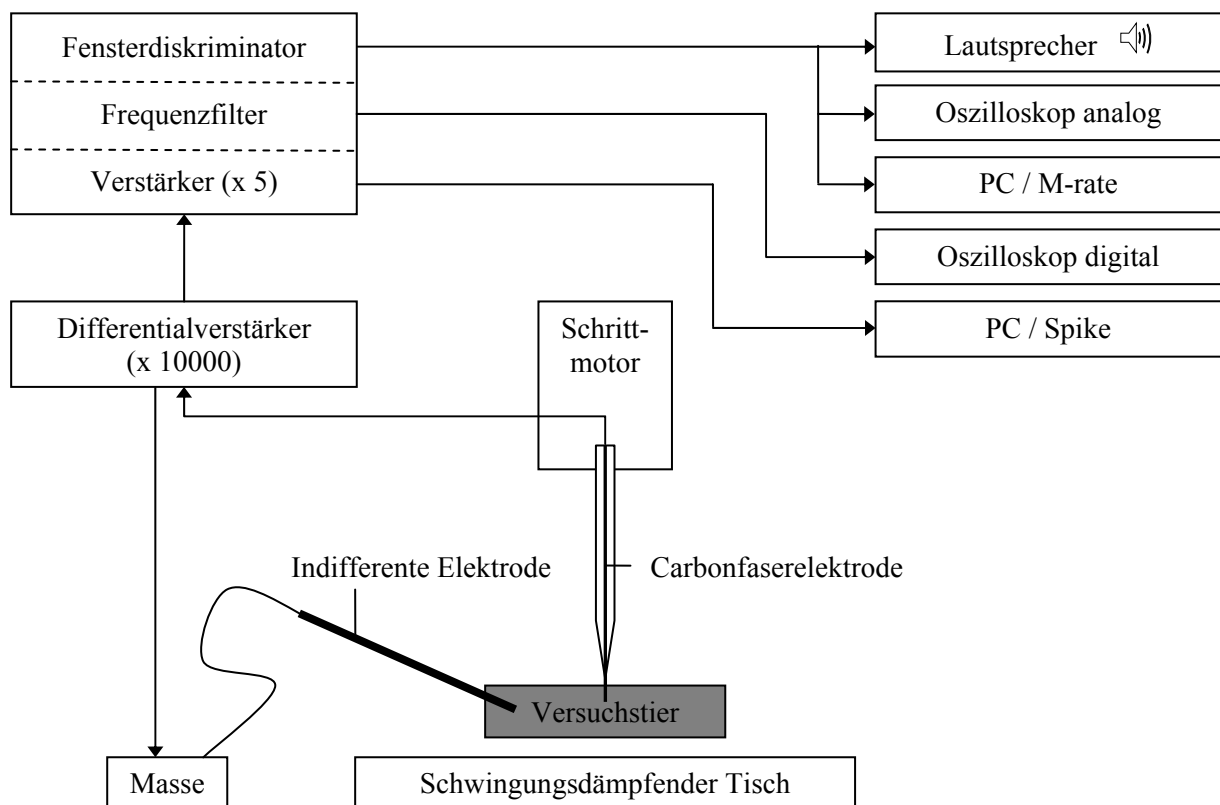


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Meßstandes

3.2. Versuchsvorbereitung

Die Tierversuche erfolgten nach Genehmigung durch das Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz (Genehmigungs-Nr. 02-29/01) gemäß der Vorschriften des Tierschutzgesetzes. Sie wurden an 97 männlichen Wistar-Ratten (315-396 g, Universität Jena) in Allgemeinnarkose durchgeführt. Nach Durchführung des Experimentes wurden die Tiere durch eine hohe Dosis Thiopental (100 mg i.v.) getötet.

3.2.1. Narkose und Überwachung der Vitalparameter

Zur Narkoseeinleitung erhielten die Tiere 110-150 mg/kg KG Thiopental (Trapanal®, Altana Pharma, Konstanz) intraperitoneal. Die Beurteilung der Narkosetiefe während des Versuches erfolgte anhand von Atemfrequenz, Korneal- und Wegziehreflex sowie Veränderungen des Spontanentladungsverhaltens der abgeleiteten Nervenzellen. Bei Bedarf, z.B. wenn Atemfrequenz und -tiefe während noxischer Reizung anstiegen, wurden 5-10 mg des

Anästhetikums nachinjiziert. Blutdruck (Blutdruckmonitor BP-1-B, WPI, New Heaven, USA) und rektale Temperatur wurden während des gesamten Experimentes kontinuierlich überwacht und auf physiologischen Werten gehalten (arterieller Mitteldruck 100-120 mmHg, Körpertemperatur $37 \pm 1^\circ \text{C}$). Das Auskühlen des Versuchstieres verhinderte eine feedback-gesteuerte Heizfolie (Temperature Constanter L/M-60, List Medical Electronics, Darmstadt).

3.2.2. Erzeugen der Entzündung

Bei allen Versuchstieren wurde durch Injektion von Kaolin (Porzellanstaub) und Carrageenan (Algenextrakt) eine akute Monoarthritis im linken Kniegelenk ausgelöst. Dies erfolgte entweder zu Beginn der Präparation, um vor der Ableitung 6-7 h für die vollständige Entzündungsentwicklung zu geben oder während der Ableitung eines ipsilateralen Neurons, um die Auswirkung der Testsubstanzen in der Frühphase der Entzündung zu beobachten.

Nach sorgfältiger Rasur des linken Beines wurde eine 27-Gauge Nadel (Braun, Melsungen) durch das Ligamentum patellae in den Gelenkspalt eingeführt und es wurden 70 µl einer 4%-igen Kaolinlösung (Sigma, Deisenhofen) injiziert. Die Extremität wurde für 15 min im Kniegelenk langsam gebeugt und gestreckt, daraufhin wurden 70 µl 2%-iges Carrageenan (Sigma) injiziert, und das Bein für weitere 5 min bewegt. Abschließend wurde ein Watteverband angelegt. Um den Injektionserfolg zu kontrollieren und einen möglichen Einfluß der COX-Inhibitoren auf die Ödementstehung zu beurteilen, erfolgte vor dem Setzen der Entzündung sowie nach Abschluß des Experimentes die Feststellung des Knieumfanges mit einem Maßband.

3.2.3. Präparation

Die Tiere wurden tracheotomiert. Während des Versuches atmeten die Tiere spontan. Sauerstoff wurde zur Verbesserung der Geweboxygenierung mit einem Fluß von 1 l/min in die Nähe der Trachealkanüle geleitet. Anschließend erfolgte die Darstellung der Halsgefäße durch stumpfe Präparation. Zur Blutdruckmessung wurde ein Katheter in die Arteria carotis communis eingeführt, ein zweiter in der Vena jugularis externa diente der Applikation von Glukose 5% bzw. Thiopental.

Die Freilegung der Wirbelbögen im Lumbalbereich (L1-L4) erfolgte durch Hautschnitt und Ablösung der paravertebralen Muskulatur. Die Versuchstiere wurden anschließend in einen stereotaktischen Rahmen gespannt. Je 4 Schwanenhalsklemmen unter den Processi transversi beider Seiten stabilisierten die Wirbelsäule. So fixiert war das Rückenmark weitestgehend

von den Atembewegungen des Tieres entkoppelt. Zusätzlich stand der stereotaktische Rahmen zur Verbesserung der Ableitbedingungen auf einem schwingungsdämpfenden Tisch, der durch pneumatische Steuerung Vibrationen abfangen konnte. Nach Laminektomie mittels einer Knochenzange in Höhe der Wirbel L1-L4 und Spülung der Präparationsgebietes mit Tyrode-Lösung wurde unter mikroskopischer Sicht (M5A, Wild, Heerbrugg, Schweiz) die Dura mater mit einer Vannas-Schere (Geuder, Heidelberg) eröffnet und so das Rückenmark freigelegt. Seitlich wurden Hautlappen mobilisiert, mittels einer Haltenaht am Metallrahmen fixiert und auf diese Weise eine Wanne für den Agar um das Operationsfeld angelegt.

3.2.4. Abgrenzung des Ableitgebietes

In dem durch die Präparation auf einer Länge von ca. 3 cm freigelegten Rückenmark befinden sich in somatotopischer Anordnung Nervenzellen mit Einstrom aus der gesamten unteren Extremität (Swett & Woolf, 1985; Maslany et al., 1992). Um das Areal, in dem bevorzugt Neurone mit nozizeptivem Eingang aus dem Knie lokalisiert sind, näher einzugrenzen, wurde eine Carbonfaserelektrode etwa in der Mitte zwischen Vena spinalis posterior und dem Eintritt der Hinterwurzeln unter mikroskopischer Sicht auf das Rückenmark aufgesetzt. Mittels eines elektrischen Schrittmotors (SMS 87, TC Elektronik, Würzburg) konnte die Elektrode in μm -Schritten durch das Rückenmark bewegt werden. Mit einem 3x5 cm großen, ovalen Plastikring wurde der Bereich eingegrenzt, in dessen Tiefe sich durch mechanische Stimulation des Kniegelenkes aktivierbare Hinterhornneurone befanden. Die Unterkante des Ringes wurde mit Vaseline gegen die Rückenmarksoberfläche abgedichtet. Unter Aussparung dieses abgegrenzten Areals wurde das Operationsgebiet mit Agar (2,5%-ig in Tyrode-Lösung; Fluka, Deisenhofen) bedeckt, um es zum einen vor Austrocknung zu schützen und zum anderen dem Rückenmark mehr Stabilität zu verleihen.

Plastikrähmchen und Agar bildeten über dem freigelegten Rückenmark einen „Pool“ mit circa 50 μl Fassungsvermögen, der mit Tyrode-Lösung gefüllt wurde. Bei Versuchsbeginn wurde diese gegen die entsprechenden Vehikel bzw. Testsubstanzen ausgetauscht.

3.2.5. Aufsuchen und Charakterisierung von Neuronen

Nach vollendeter Präparation wurden in dem abgegrenzten Rückenmarkabschnitt mittels einer Carbonfaserelektrode, wie unter Abschnitt 2.2.3. bereits beschrieben, Neurone mit Gelenkafferenz aufgesucht. Dabei wurde das Kniegelenk manuell komprimiert und die Elektrode mit Hilfe eines Steppmotors schrittweise in das Hinterhorn hineinbewegt. Gelangte die Elektrode

in die Nähe einer geeigneten Nervenzelle, wurden am Oszilloskop Aktionspotentiale sichtbar, die deutlich über dem Grundrauschen lagen und mit Zeitpunkt und Intensität des ausgeübten Druckes korrelierten. Die Amplituden der Aktionspotentiale wurden durch Elektrodenpositionierung maximiert. Die Zugehörigkeit der Aktionspotentiale zu einem Neuron konnte anhand ihrer Größe und Form beurteilt werden. Bei Verwendung extrazellulärer Elektroden werden technisch bedingt teilweise zwei oder mehr Nervenzellen abgeleitet, deren Diskrimination bei der Auswertung Probleme bereiten kann. Deswegen wurden „saubere“ Potentiale, die sicher von einer einzelnen Zelle stammten, bevorzugt.

Um sicher zu stellen, daß die Aktivierung der Neurone hauptsächlich durch Schmerzrezeptoren aus dem Gelenk bzw. benachbarter tiefer Gewebsstrukturen (Muskeln, Bänder, etc.) zustande kam und nicht durch Afferenzen aus der Haut über dem Kniegelenk oder von Propriozeptoren, wurde mit einer Pinzette die Haut des Beines systematisch bestrichen und gekniffen, manuell Druck auf Kniegelenk, Sprunggelenk, Pfote und Muskulatur ausgeübt und Stellungswechsel des Beines durchgeführt. Für die weitere Untersuchung kamen nur nozizeptive Neurone ohne kutanes rezeptives Feld über dem Kniegelenk in Betracht. Die Ausdehnung des mittels dieser Manipulationen bestimmten rezeptiven Feldes wurde anschließend im Protokoll dokumentiert.

Die Nervenzellen wurden basierend auf ihrem Antwortverhalten und ihren Erregungsschwellen für nicht-noxische und noxische mechanische Reize am Kniegelenk in zwei Gruppen eingeteilt (Schaible et al., 1987a). Die Gruppe der nozizeptiv spezifischen HT (high threshold)-Neurone konnte nur durch starke mechanische Reize aktiviert werden. WDR (wide dynamic range)-Neurone hingegen antworteten schon auf nicht-noxische Reize wie leichten Druck und reagierten bei Steigerung der Reizintensität mit einem Frequenzanstieg.

Ein Neuron wurde dann für das Versuchsprotokoll herangezogen, wenn es folgende Kriterien erfüllte:

- Aktivierbarkeit durch Kompression des Kniegelenkes
- Größe der Amplitude mindestens das Dreifache des Grundrauschens
- Unabhängigkeit der Amplitudengröße von Atembewegungen des Tieres und von der mechanischen Reizung

Spontanaktivität bis 10 Hz bzw. Nachentladungen (i.e. Andauern der Aktionspotentiale über die Applikation des mechanischen Reizes hinaus) stellten keine Ausschlußkriterien dar.

3.3. Testsubstanzen

Folgende Lösungen fanden für die lokale Applikation auf das Rückenmark bzw. intraperitoneale Gabe Verwendung:

- **L-745,337** ([5-Methansulfonoamido-6-(2,4-difluorothiophenyl)-1-indan]; Merck Frosst, Kirkland, Canada)
 - spinal: 0,3, 1,5 bzw. 3 mM in 5%-iger Glukoselösung (Braun, Melsungen); pH 8,5
 - i.p.: 0,4 mg/kg Körpergewicht (KG) in Glukose 5%; pH 8,4
- **SC-560** (5-(4-Chlorphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol; Cayman Chemical, Ann Arbor, USA)
 - spinal: 1,5 bzw. 3 mM in aqua dest., 50% Dimethylformamid (DMF); pH 7,4
 - i.p.: 1 mg/kg KG in aqua dest., 50% DMF; pH 7,4
- **Indometacin** (1-(4-Chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indolessigsäure; Calbiochem, La Jolla, USA)
 - spinal: 8 mM in 0,9% NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 17,65 mM NaOH; pH 7,5
- **Diclofenac** ([2-(2,6-Dichloranilino)phenyl]essigsäure; Cayman Chemical)
 - spinal: 3 mM in Tyrode-Lösung, 0,07% EtOH; pH 7,5
 - i.p.: 4 mg/kg KG in Tyrode-Lösung, 0,07% EtOH; pH: 7,4
- **PGE₂** ((5Z)-11 α ,13E,15S)-11,15-Dihydroxy-9-oxo-5,13-prostadiensäure; Cayman Chemical)
 - spinal: 100 ng/ μ l in Tyrode-Lösung, 0,007% EtOH; pH: 7,4

Tyrode-Lösung: 127,8 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 9 mM CaCl, 2,1 mM MgCl, 9,8 mM NaHCO₃, 0,15 mM NaH₂CO₃ in aqua dest.; pH 7,3

Die Einstellung des pH der Lösungen erfolgte mit 0,1 M HCl oder 0,1 M NaOH. Die geringe Löslichkeit L-745,337 und SC-560 machte die Testung höherer Konzentrationen unmöglich und bedingte bei L-745,337 zudem eine Einstellung auf unphysiologische pH-Werte.

75-400 μ l der gebrauchsfertigen Lösungen wurden in Reaktionsgefäße (0,7 ml, Eppendorf, Hamburg) abgefüllt, bis zu Versuchsbeginn bei -20 °C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad bei 37 °C aufgewärmt. Bei jedem Versuch wurde vor Applikation der Testsubstanz das entsprechende Lösungsmittel allein auf das Rückenmark gegeben, um eine eventuelle Beeinflussung der neuronalen Aktivität durch das Vehikel auszuschließen.

3.4. Versuchsprotokolle

3.4.1. Mechanische Reizung von Knie, Sprunggelenk und Pfote

Als Maß für die Veränderung der Aktivität nozizeptiver Hinterhornneurone unter Einwirkung der Testsubstanzen diente die Aufzeichnung der Anzahl von Antwortpotentialen auf mechanische Reizung. Die Stimuli wurden in zwei standardisierten Intensitäten auf Kniegelenk, Sprunggelenk und Pfote appliziert (vom Untersucher wurde der nicht-noxische Stimulus am kleinen Finger als leichter Druck empfunden, der noxische Stimulus als schmerzhaft).

Auf die Außenseite des linken Kniegelenkes wurde Druck mit einer geeichten Vorrichtung (Correx; Haag-Streit, Bern, Schweiz) in Form eines Stempels ausgeübt. Für die nicht-noxische Reizung wurde ein Kompressionsdruck von $1,9 \text{ N}/40\text{mm}^2$ und für die noxische Reizung von $7,8 \text{ N}/40\text{mm}^2$ angewendet. Mit zwei modifizierten Krokodilklemmen, deren Zähne abgefeilt und deren Backen mit Klebeband umwickelt waren, wurde das Sprunggelenk mediolateral und die Pfote dorsoventral mit einer Intensität von $1,1 \text{ N}/20\text{mm}^2$ (nicht-noxisch) und $5,8 \text{ N}/20\text{mm}^2$ (noxisch) komprimiert.

Knie, Sprunggelenk und Pfote wurden nacheinander jeweils für 15 s zuerst mit nicht-noxischer und anschließend mit noxischer Intensität gereizt. Zwischen jedem Stimulus wurde eine Pause von 15 s gewährt. Nach der noxischen Reizung der Pfote folgte eine Pause von 2 min, bevor mit der nächsten Reizserie fortgefahren wurde. Insgesamt umfaßte eine Reizserie 5 min.

3.4.2. Protokolle der einzelnen Testsubstanzen

Ziel der Experimente war es, die Antworten einzelner Nervenzellen auf mechanische Reizung im Verlauf einer Kniegelenkentzündung zu beobachten und den Einfluß von COX-Inhibitoren auf diese Antworten zu testen. Nach Identifizierung eines geeigneten Neurons wurde mit der Applikation der standardisierten mechanischen Reize begonnen. Im Regelfall stabilisierten sich die Antworten der Nervenzelle auf rhythmische mechanische Stimulation nach einiger Zeit. Zeigte das Neuron bei sechs aufeinanderfolgenden Reizungen ein stabiles Antwortenverhalten wurde die sich bis dahin auf dem Rückenmark befindende Tyrode-Lösung gegen die entsprechende Vehikel-Lösung (siehe Abschnitt 2.3.) ausgetauscht, und sechs weitere Reizserien wurden durchgeführt. Im folgenden werden die gemittelten

Reizantworten dieser Kontrollperiode, in der sich nur das Vehikel auf dem Rückenmark befand, als Baseline-Aktivität bezeichnet. Anschließend wurde die Vehikel-Lösung aus dem Rückenmarkpool entfernt und statt dessen die entsprechende Testlösung appliziert.

Basierend auf unterschiedlichen Fragestellungen variierten die Applikationsschemata der Testsubstanzen in den Experimenten. Abbildung 4 gibt eine Übersicht über die im folgenden detailliert beschriebenen Protokolle.

3.4.2.1. Applikation vor Induktion der Entzündung

In dieser Versuchsreihe sollte die Rolle von COX-1 und COX-2 bei der Entstehung entzündungsinduzierter spinaler Hyperexzitabilität untersucht werden. Bezüglich dieser Fragestellung wurden zwei selektive Hemmer der COX-Isoenzyme vor der Erzeugung und während der Entstehung einer Kniegelenkentzündung spinal appliziert.

- Zunächst erfolgte die Aufzeichnung der Baseline-Antworten der Hinterhornneurone. In dieser Zeit befand sich entweder das Vehikel (Glukose 5%) oder Tyrode-Lösung (Kontrolltiere) auf dem Rückenmark. In den folgenden 30 min wurde der Effekt des selektiven COX-2-Inhibitors L-745,337 in einer Konzentration von 3 mM bzw. Vehikel im nicht-entzündeten Tier getestet. Erst dann wurde durch die Injektion von Kaolin und Carrageenan (K/C) in den Kniegelenkspalt eine Monoarthritis erzeugt. Nach den für die Induktion der Entzündung benötigten 30 min wurden die neuronalen Antworten über weitere 210 min aufgezeichnet. In der Kontrollgruppe befand sich während des gesamten Versuches anstatt von L-745,337 das Vehikel auf dem Rückenmark.
- Das für L-745,337 beschriebene Protokoll wurde auch für die Untersuchung des COX-1-Hemmers SC-560 3 mM bzw. seines Vehikels (DMF 50% in aqua dest.) verwendet.

3.4.2.2. Applikation 6-8 h nach Induktion der Entzündung

Der zweite Versuchsansatz analysierte eine mögliche Beteiligung der Isoenzyme COX-1 und COX-2 an der Aufrechterhaltung der entzündungsinduzierten spinalen Hyperexzitabilität. Im Rahmen dieser Fragestellung wurde die Wirkung der spinalen bzw. systemischen COX-Inhibitor-Applikation auf das Antwortverhalten der nozizeptiven Neurone beurteilt, wenn die Entzündung schon für 6-8 h bei Ableitungsbeginn bestanden hatte. Diese Zeitspanne wurde gewählt, da die entstehende Übererregbarkeit der Hinterhornneurone 5-6 h nach K/C-Injektion ein Plateau erreicht. Die Antworten steigen danach im Regelfall nicht weiter an (Neugebauer et al., 1993). Generell erfolgte bei jedem dieser Experimente zunächst die Bestimmung der Baseline-Aktivität der abzuleitenden Nervenzelle über 30 min.

- Die spinale Wirkung von L-745,337 wurde bei etablierter Hyperexzitabilität in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,3 und 3 mM) untersucht. Bei den Kontrolltieren verblieb das Vehikel (Glukose 5%) im Rückenmarkpool. Die neuronalen Antworten auf mechanische Reize an Knie, Sprunggelenk und Pfote wurden für diesen Datensatz über 100 min aufgezeichnet. Im Anschluß wurde den mit L-745,337 3 mM bzw. Vehikel behandelten Tieren eine Dosis L-745,337 0,4 mg/kg KG intraperitoneal verabreicht und die Auswirkung der systemischen Gabe über 50 min beobachtet.
- Zur Klärung der Frage, ob die Wirkung von L-745,337 eine Sättigung erreicht bzw. wie weit die Reizantworten der übererregbaren Nervenzellen durch die Anwesenheit des COX-2-Inhibitors im Rückenmark absinken, wurden bei 4 Versuchstieren die Antworten auf mechanische Reizung über 200 min aufgezeichnet.
- Bei weiteren 6 Tieren erfolgte nach der Behandlung mit L-745,337 3 mM die Testung der simultanen Anwendung von PGE₂ und L-745,337. Für diese Untersuchung wurden nach 100 min zu der sich im Rückenmarkpool befindenden L-745,337 3 mM-Lösung 30 µl einer PGE₂ enthaltenden Lösung (100 ng/µl) gegeben und die neuronalen Antworten auf mechanische Reizung für weitere 50 min aufgezeichnet.
- An 7 Tieren sollte die Wirkung der spinalen bzw. der systemische Applikation des selektiven COX-1-Inhibitors SC-560 beurteilt werden. Unter dieser Fragestellung wurde SC-560 in einer Konzentration von 3 mM auf das Rückenmark gegeben und die Antworten auf mechanische Stimuli über 60 min aufgezeichnet. Im Anschluß erfolgte die Injektion einer Dosis SC-560 (1 mg/kg KG) intraperitoneal und die weitere Beobachtung des Antwortverhaltens für 60 min.
- Um den Effekt nicht-selektiver COX-Inhibitoren bei etablierter Hyperexzitabilität mit der Wirkung von L-745,337 zu vergleichen, wurde zunächst bei 3 Tieren Indometacin in einer Konzentration von 8 mM und bei weiteren 6 Tieren Diclofenac in einer Konzentration von 3 mM für 60 min spinal appliziert. Im Anschluß wurden die Wirkstoffe aus dem Rückenmarkpool entfernt, statt dessen L-745,337 3 mM appliziert und die neuronalen Reizantworten über weitere 60 min aufgezeichnet.
- Im Rahmen dieser Fragestellung wurde auch die kombinierte Anwendung von SC-560 und L-745,337 untersucht. Aufgrund der schlechten Löslichkeit dieser beiden Substanzen konnte die Applikation auf das Rückenmark nur in einer Konzentration von jeweils 1,5 mM (Vehikel: DMF 25%, Glukose 2,5% in aqua dest.) erfolgen. Nach Erfassung der neuronalen Antworten über 100 min wurde anschließend L-745,337 (1,5 mM in Glukose 5%) auf das Rückenmark gegeben.

1. Induktion der Entzündung (K/C) während der Ableitung

Vehikel	L-745	K/C	L-745 3 mM	n=6
Tyrode	Vehikel	K/C	Vehikel (Glukose 5%)	n=7
Vehikel	SC-560	K/C	SC-560 3 mM	n=6
Tyrode	Vehikel	K/C	Vehikel (DMF 50%)	n=3

2. Ableitung bei etablierter Entzündung (6-8 h nach K/C)

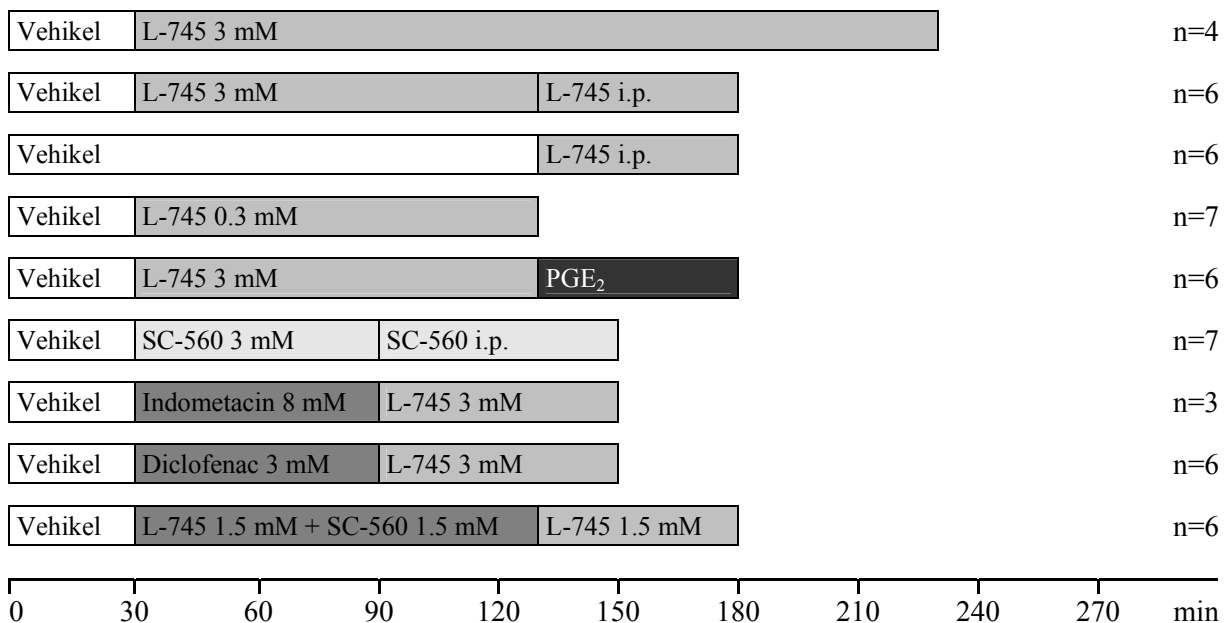


Abbildung 4: Darstellung der Versuchsprotokolle im Zeitverlauf.

Soweit nicht anderweitig gekennzeichnet erfolgte die Applikation der Testsubstanzen spinal; i.p. = intraperitoneale Applikation; L-745 = L-745,337; Vehikel = entsprechendes Lösungsmittel der jeweiligen Testsubstanz, siehe Abschnitt 2.3.; n = Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe, ein Neuron pro Tier.

3.5. Datenanalyse und Statistik

Im Rahmen der hier dargelegten Arbeit wurden insgesamt 97 Ratten präpariert. Jedes Tier diente der Ableitung eines Hinterhornneurons, es wurden niemals mehrere Protokolle an einem Tier durchgeführt.

Von 2 Tieren konnten keine Daten erhoben werden, da kein geeignetes Neuron mit der extrazellulären Elektrode lokalisiert werden konnte. Zusätzlich wurden aufgrund folgender Kriterien 19 Experimente von der Auswertung ausgenommen:

- Verlust des Zellsignals während der Ableitung einer Nervenzelle
War der Datensatz für eine Zelle bis auf wenige zu diesem Zeitpunkt verbleibende Reizserien vollständig, wurden die Werte ungeachtet dessen in die Auswertung aufgenommen.
- Präzipitatbildung auf dem Rückenmark aufgrund schlechter Löslichkeit der Testsubstanzen
In solchen Fällen wurde von einer ungenügenden Konzentration des Wirkstoffes am Wirkort ausgegangen und das Experiment nicht berücksichtigt.
- Fehler beim Setzen der Entzündung, i.e. Kaolin oder Carrageenan wurden unbeabsichtigt nicht direkt in den Kniegelenkspalt, sondern in umliegendes Gewebe injiziert
- vorzeitiger Tod des Versuchstieres während des Experimentes

Die mit der SPIKE-Software aufgezeichneten Aktionspotentiale wurden mit Hilfe des Programms SPIDI (Version 2.9., 09/2001, Forster und Handwerker, Erlangen) ausgewertet. Artefakte und Aktionspotentiale anderer Zellen konnten aufgrund divergierender Form und Größe aus der Zählung genommen werden. Das Programm zählt die Anzahl der Spikes für ein festes Zeitintervall (15 s pro Reizung).

Für die statistische Auswertung der Daten wurden zunächst bei jedem einzelnen Experiment die Mittelwerte von 6 Antworten vor (Baseline-Aktivität) sowie die letzten 3 Antworten unter Einwirkung der jeweiligen Testsubstanz berechnet. Die entsprechenden Mittelwerte aller Versuchstiere einer Gruppe wurden wiederum zusammengefaßt und Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SEM) berechnet. Die Veränderungen der neuronalen Antworten nach Applikation der Testsubstanzen wurden zunächst in Bezug auf die Baseline-Aktivität bewertet. Der Wilcoxon-Rangtest für gepaarte Stichproben diente dem Vergleich der mittleren Antworten im Zeitverlauf innerhalb eines Versuches. Unterschiede

zwischen Verumgruppe und Kontrollgruppe bzw. anderen Substanztestgruppen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Testes auf Signifikanz überprüft. Signifikanz wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen. Die statistische Auswertung erfolgte immer mit den Rohdaten.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten wurden teilweise für die Abbildungen normierte Reizantworten verwendet. Hierfür wurde bei jedem Neuron der Mittelwert der Baseline-Antworten von allen Reizantworten vor und nach Substanzapplikation subtrahiert. Im Anschluß wurden dann je nach Darstellung die entsprechenden neuronalen Antworten einer Versuchsgruppe entweder für jede einzelne Reizung oder in Zeitintervallen gemittelt (Achsenbeschriftung: Impulse/15 s über der Baseline).

Für die verschiedenen Gruppen wurde außerdem die prozentuale Veränderung der Reizantworten durch Substanzeinwirkung berechnet. Die Baseline-Aktivität entsprach dabei 100% und die Aktivität nach Applikation des jeweiligen Wirkstoffes wurde in Prozent der Baseline (Achsenbeschriftung: % der Baseline) angegeben.

4. ERGEBNISSE

4.1. Charakterisierung der spinalen Neurone

4.1.1. Lokalisation und Klassifikation

Die Neurone mit nozizeptiver Afferenz aus dem Knie waren in den Segmenten L1-L4 im Mittel in einer Tiefe von $937 \pm 233 \mu\text{m}$ (331-1310 μm) und somit hauptsächlich im tiefen Hinterhorn in den Laminae IV-VI (nach Rexed) lokalisiert.

Bei 22 Neuronen lag zum Zeitpunkt der Charakterisierung keine Entzündung vor. Neun dieser Neurone konnten als HT- und 13 als WDR-Neurone identifiziert werden.

In den Versuchsgruppen mit K/C-Injektion 6-8 h vor Ableitungsbeginn wurden von 54 Neuronen 50 dem WDR-Typ und 4 der HT-Gruppe zugeordnet. 17 dieser Neurone zeigten Spontanaktivität mit einer Frequenz von 1,3-8 Hz. Bezüglich der Tiefenlokalisierung der beiden Neuronentypen ergaben sich keine Unterschiede.

4.1.2. Rezeptive Felder

Nozizeptive Rückenmarkneurone erhalten konvergenten Einstrom von mehreren Afferenzen, die entweder aus demselben Organ oder aus verschiedenen Organen stammen. So kann ein spinales Neuron beispielsweise nozizeptiven Einstrom aus Haut und viszerale Organen oder Haut und Sehnen, Muskel, Gelenkstrukturen beziehen. Ein großer Anteil dieser Rückenmarkneurone kann außerdem durch afferenten Einstrom von Nichtnozizeptoren erregt werden.

Wie in Abschnitt 2.2.4. schon beschrieben, erfolgte die detaillierte Bestimmung des rezeptiven Feldes vor Beginn des Experimentes, i.e. auch vor Applikation der Testsubstanzen. Alle abgeleiteten Neurone konnten durch Kompression des Kniegelenkes und zum großen Teil zusätzlich durch mechanische Stimulation an Sprunggelenk und Pfote aktiviert werden. Typischerweise umfaßte das rezeptive Feld somit tiefe Gewebestrukturen (Bänder, Synovia, Periost etc.) des Ober- sowie Unterschenkels und der Pfote. Außerdem antwortete eine Anzahl von spinalen Nervenzellen auf Bestreichen oder Kneifen der Haut, Kompression der Oberschenkelmuskulatur und/oder Bewegungen im Arbeitsbereich der Extremität. In allen

Fällen handelte es sich dabei um Neurone vom WDR-Typ. Die kutanen rezeptiven Felder befanden sich jedoch niemals über dem Kniegelenk.

Die folgende Übersicht (Tab. 1) gibt die Verteilung sowie den prozentualen Anteil an der gesamten Neuronenpopulation (n=76) wieder.

Tabelle 1: Aktivierbarkeit der Neurone.

Der linke Teil der Tabelle enthält die jeweilige Gesamtzahl der durch mechanische Stimulation an Knie, Sprunggelenk und Pfote aktivierbaren HT- bzw. WDR-Neurone. Im rechten Teil ist der Anteil der Neurone mit alleiniger Aktivierbarkeit durch Kompression von Knie-, Sprunggelenk und Pfote (nur Gelenke) im Gegensatz zu den Neuronen mit zusätzlichen Afferenzen aus Haut, Oberschenkelmuskulatur bzw. Erregbarkeit durch Bewegung des Kniegelenkes wiedergegeben.

Typ	Knie	Sprung- gelenk	Pfote	nur Gelenke	auch Haut	auch Muskel	auch Bewegung
WDR	63	62	33	38	16	7	7
HT	13	13	4	13	0	0	0
Gesamt	76	75	37	51 (67 %)	16 (21 %)	7 (9 %)	7 (9 %)

4.2. Einfluß der spinalen Applikation von L-745,337 und SC-560 auf die Entstehung entzündungsinduzierter Hyperexzitabilität

Bei insgesamt 12 Tieren wurde die Auswirkung der selektiven Inhibition der COX-1 durch SC-560 bzw. der COX-2 durch L-745,337 im Rückenmark vor und während der Entstehung einer akuten Arthritis untersucht. Weitere 10 Ratten wurden als Kontrolltiere geführt. Zunächst erfolgte die Bestimmung der Baseline-Aktivität der Hinterhornneurone über 30 min. In dieser Zeit befand sich entweder das entsprechende Vehikel (L-745,337- bzw. SC-560-Gruppe) oder Tyrode (Kontrollgruppen) auf dem Rückenmark. Danach wurde die Wirkung von L-745,337 (n=6) und SC-560 (n=6) in einer Konzentration von jeweils 3 mM bzw. Vehikel (Glukose 5%, n=7 bzw. DMF 50% in aqua dest., n=3) im nicht-entzündeten Tier getestet. In keiner der Gruppen konnte eine Veränderung der neuronalen Reizantworten innerhalb dieses Zeitraumes festgestellt werden (Abb. 5 und 6). Im Anschluß erfolgte bei allen Tieren die Injektion von Kaolin und Carrageenan (K/C) in den Kniegelenksspalt.

4.2.1. Effekt der spinalen Applikation von L-745,337 3 mM

Abbildung 5 illustriert den Effekt der spinalen Applikation von L-745,337 bzw. Vehikel (Glukose 5%) vor und während der Entstehung einer Entzündung im Kniegelenk.

In der Kontrollgruppe verursachte die K/C-Injektion eine Entzündung mit Zunahme des Knieumfanges von $5,6 \pm 0,2$ auf $6,4 \pm 0,1$ cm und eine signifikante Steigerung der neuronalen Antworten auf noxische mechanische Reize sowohl am entzündeten Kniegelenk als auch am nicht-entzündeten Sprunggelenk (Tab. 2). Vier der Neurone zeigten eine Vergrößerung ihres rezeptiven Feldes auf die Pfote, i.e. neuronale Antworten konnten jetzt auch durch noxische Reizung der Pfote ausgelöst werden. Bei 2 Neuronen stiegen die Antworten auf Pfotenstimulation an. Nur 3 Neurone konnten vor Induktion der Entzündung durch nicht-noxische Stimulation am Kniegelenk aktiviert werden, an Sprunggelenk und Pfote waren Reize nicht-noxischer Intensität immer unterschwellig. Bei 5 der 7 Neuronen trat nach K/C-Injektion eine Absenkung der Erregungsschwellen auf, i.e. auch durch Druck nicht-noxischer Intensität konnten nun Antworten hervorgerufen werden. Die durchschnittliche Erhöhung der Reizantworten in der 4. Stunde nach K/C im Vergleich zur Baseline war sowohl für noxische als auch für nicht-noxische Intensitäten an Kniegelenk, Sprunggelenk und Pfote signifikant ($p < 0,05$, Wilcoxon-Rangtest für gepaarte Stichproben).

Bei den mit L-745,337 behandelten Tieren hingegen stellte sich eine Entzündung im Kniegelenk mit einer Zunahme des Knieumfanges von $5,5 \pm 0$ auf $6,5 \pm 0,2$ cm ein, die Antworten nozizeptiver Hinterhornneurone auf noxische mechanische Reizung stiegen nach K/C-Injektion jedoch nicht wie in der Kontrollgruppe an (Tab. 2, Abb. 5). Vielmehr fiel auf Kniegelenkreizung tendenziell eine Abnahme der Antworten im Vergleich zu den Werten vor Induktion der Entzündung auf. Diese war im Zeitintervall 120-150 min nach K/C mit einer Reduktion der Antwortstärke auf 72 % der Baseline am ausgeprägtesten, erlangte im Wilcoxon-Rangtest für gepaarte Stichproben jedoch keine Signifikanz. Am Sprunggelenk kam es im Mittel zu einer geringen Zunahme der Spikeanzahl gegenüber den Werten vor Entzündungsinduktion. Es zeigte sich keine Ausdehnung des initialen rezeptiven Feldes, i.e. keine der Zellen entwickelte nach K/C-Injektion eine Antwort auf Druckreiz an der Pfote. Außerdem trat im Gegensatz zur Kontrollgruppe keine Sensibilisierung gegenüber nicht-noxischen Reizen auf. Für die statistische Analyse wurden die Reizantworten in 30-Minuten-Intervallen zusammengefaßt und mit den entsprechenden Werten der Kontrollgruppe verglichen. Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe konnten mittels des Mann-Whitney-U-Testes für die noxische Knie- und Pfotenstimulation ab der 2. Stunde nach K/C-Injektion, für die Stimulation des Sprunggelenkes jedoch erst nach 150 min nachgewiesen werden.

Tabelle 2: Antworten nozizeptiver Hinterhornneurone unter Einwirkung von L-745,337 bzw. Vehikel während der Entwicklung einer akuten Kniegelenkentzündung.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von 6 Antworten jeweils aller Tiere einer Versuchsgruppe auf mechanische Reizung vor Applikation von L-745,337 (n=6) bzw. Vehikel (n=7) und Entzündungsinduktion im Vergleich zu den 6 Antworten im Zeitraum 210-240 min nach Injektion von Kaolin und Carrageenan unter Einwirkung von L-745,337 bzw. Vehikel (in Impulsen/15 s).

Stimulus		Kontrolle (Glukose 5%)		L-745,337 3 mM	
		vor	nach	vor	nach
Knie:	- nicht-noxisch	15 \pm 18	80 \pm 68	44 \pm 32	34 \pm 20
	- noxisch	204 \pm 180	859 \pm 435	272 \pm 153	192 \pm 78
Sprunggelenk:	- nicht-noxisch	1 \pm 2	73 \pm 112	4 \pm 5	16 \pm 25
	- noxisch	263 \pm 218	564 \pm 438	89 \pm 82	135 \pm 124
Pfote:	- nicht-noxisch	0,7 \pm 1,3	22 \pm 23	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,3
	- noxisch	14 \pm 21	189 \pm 200	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,3

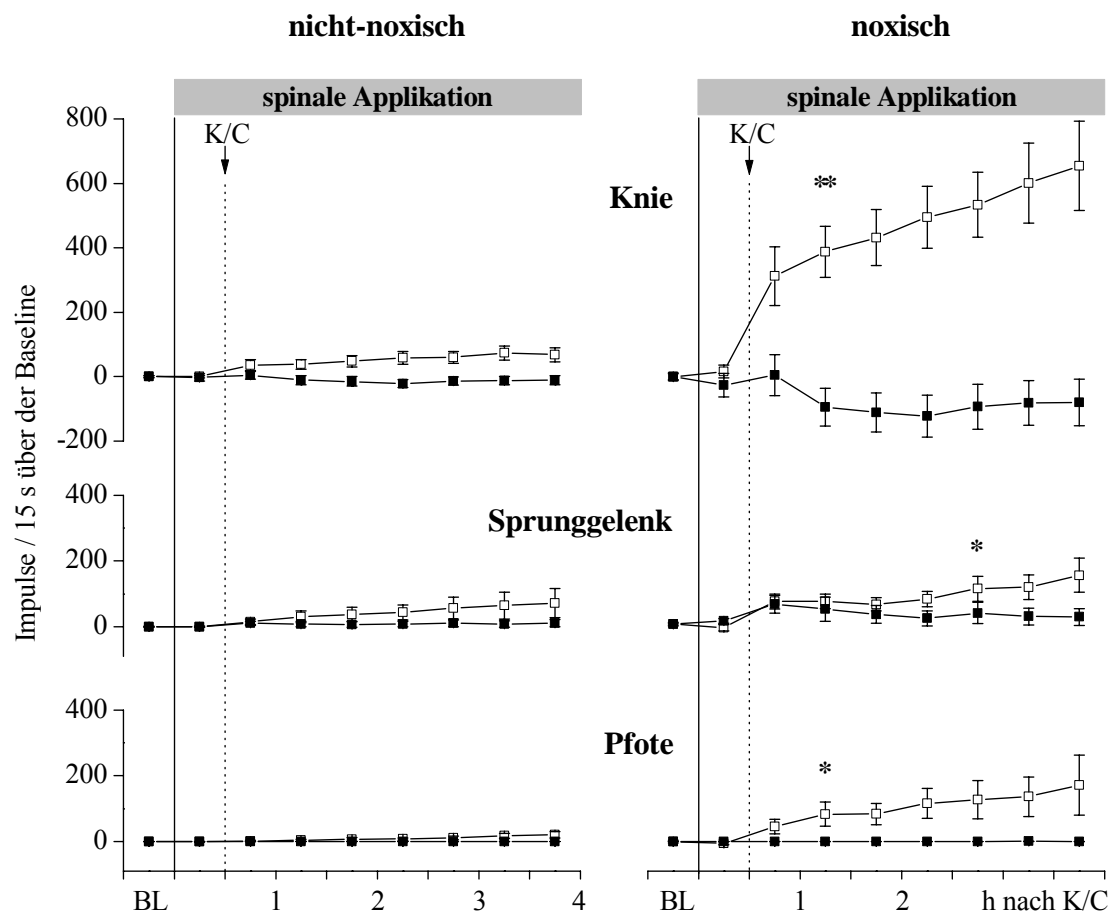


Abbildung 5: Effekt der spinalen Applikation von L-745,337 (■, n=6) bzw. Vehikel (□, n=7) auf die Entwicklung spinaler Übererregbarkeit während einer Entzündung im Kniegelenk.

Die Graphen zeigen die Veränderung der Antworten nozizeptiver Hinterhornneurone auf nicht-noxische und noxische mechanische Reizung vor und nach K/C-Injektion in den Gelenkspalt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Baseline-Antworten vor Wirkstoffapplikation und Entzündungsinduktion gleich null gesetzt (normierte Reizantworten). Während dieser Zeit (BL) befand sich nur das Vehikel (Glukose 5%) auf dem Rückenmark. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert \pm SEM der neuronalen Antworten von 6 aufeinander folgenden Reizungen (in Impulsen/15 s).

BL = Baseline-Aktivität. */** kennzeichnen das Zeitintervall, in dem der Unterschied zur Kontrollgruppe erstmals signifikant wurde, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Mann-Whitney-U-Test).

4.2.2. Effekt der spinalen Applikation von SC-560 3 mM

In Tabelle 3 und Abbildung 6 ist der Effekt der spinalen Applikation von SC-560 bzw. Vehikel (DMF 50% in aqua dest.) vor und während der Entwicklung einer akuten Monoarthritis auf das Antwortverhalten nozizeptiver Hinterhornneurone dargestellt.

In der Kontrollgruppe (n=3) verursachte die Injektion von Kaolin und Carrageenan eine Entzündung mit Zunahme des Knieumfanges um $1,0 \pm 0,1$ cm und eine Steigerung der Antworten auf noxische mechanische Reizung an Knie und Sprunggelenk. Zwei der 3

Neurone, die zuvor weder durch noxische noch durch nicht-noxische Stimuli an der Pfote aktiviert werden konnten, entwickelten Antworten auf diese Reize.

Die spinale Applikation von SC-560 (n=6) verhinderte die Entstehung einer reaktiven Kniegelenksschwellung nicht (Zunahme des Knieumfanges von $5,4 \pm 0,1$ auf $6,4 \pm 0,1$ cm). Durch SC-560 wurde die Aktivitätszunahme der Hinterhornneurone in den ersten zwei Stunden nach K/C-Injektion ähnlich wie unter Einwirkung von L-745,337 unterdrückt (Abb. 6). Besonders ausgeprägt war dieser Effekt bei den Antworten auf noxische Stimuli an Knie und Sprunggelenk. Der Unterschied zur Kontrollgruppe betrug 60-90 min nach K/C für die noxische Reizung des Knies im Mittel 331 Impulse/15 s und des Sprunggelenkes 196 Impulse/15 s. Für die Kniestimulation erlangte dieser Unterschied Signifikanz ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test). Danach stiegen die Antworten bis zum Ende des Experimentes auf das Niveau der Kontrollgruppe an. In Tabelle 3 sind die mittleren neuronalen Antworten vor, und 60-90 min bzw. 210-240 min nach SC-560-Applikation und Entzündungsinduktion wiedergegeben. Eine geringe Zunahme der Antworten auf nicht-noxische Stimuli konnte bei allen Neuronen an Knie und Sprunggelenk, nicht jedoch an der Pfote beobachtet werden.

Tabelle 3: Antwortverhalten der spinalen Neurone unter Einwirkung von SC-560 bzw. Vehikel während der Entwicklung einer akuten Kniegelenkentzündung.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von jeweils 6 Antworten vor der spinalen Applikation von SC-560 (n=6) oder Vehikel (n=3), bzw. 60-90 min und 210-240 min nach der Injektion von K/C unter Einwirkung von SC-560 bzw. Vehikel (in Impulsen/15 s).

Stimulus	Kontrolle (DMF 50%)			SC-560 3 mM		
	vor	1 h nach K/C	3,5 h nach K/C	vor	1 h nach K/C	3,5 h nach K/C
Knie:						
- nicht-noxisch	39 ± 25	90 ± 55	187 ± 150	35 ± 16	29 ± 15	113 ± 45
- noxisch	407 ± 35	646 ± 12	960 ± 79	391 ± 163	299 ± 146	1049 ± 206
Sprunggelenk:						
- nicht-noxisch	$1,6 \pm 2$	19 ± 14	66 ± 58	10 ± 18	11 ± 18	39 ± 26
- noxisch	89 ± 9	252 ± 154	491 ± 216	328 ± 145	295 ± 117	778 ± 202
Pfote:						
- nicht-noxisch	0 ± 0	$0,1 \pm 0,1$	35 ± 10	$0,6 \pm 1,4$	$0,1 \pm 0,1$	7 ± 12
- noxisch	0 ± 0	2 ± 1	58 ± 37	3 ± 6	2 ± 5	39 ± 48

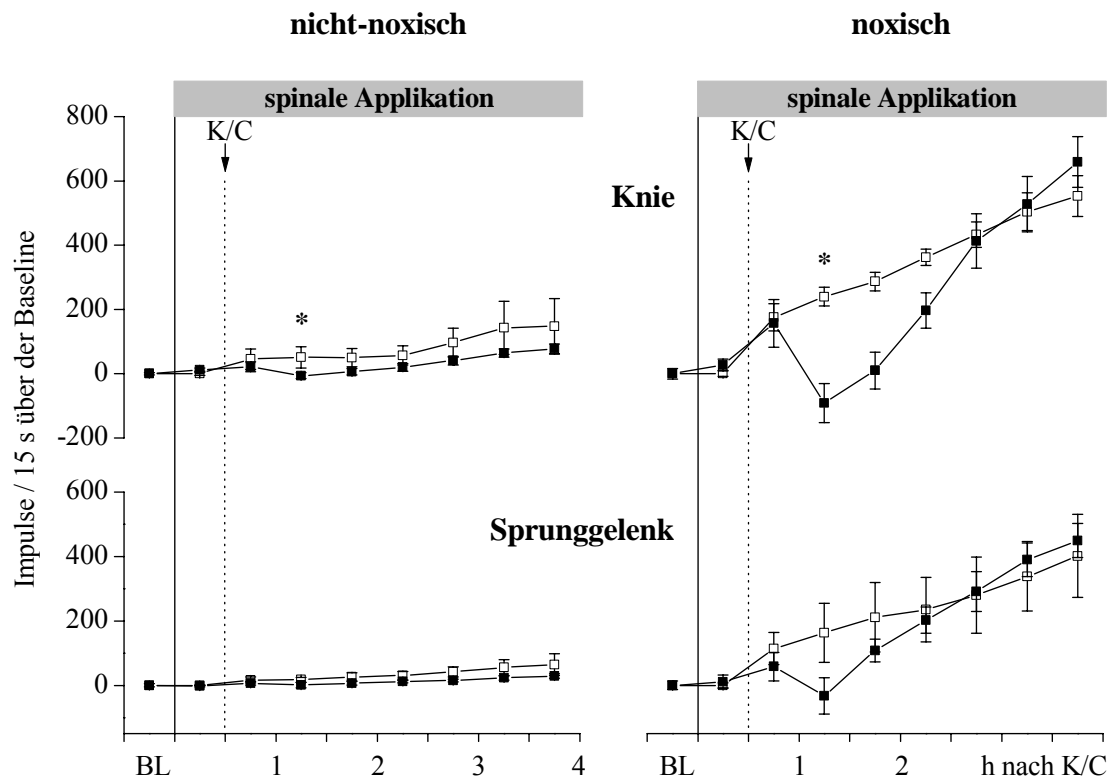


Abbildung 6: Effekt der spinalen Applikation von SC-560 (■, n=6) bzw. Vehikel (□, n=3) vor und während der Entstehung einer akuten Kniegelenkentzündung.

Die Graphen zeigen die Veränderung der Antworten nozizeptiver Hinterhornneurone auf nicht-noxische und noxische mechanische Reizung vor und nach K/C-Injektion in den Gelenkspalt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden normierte Reizantworten verwendet. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert \pm SEM der neuronalen Antworten 6 aufeinander folgender Reizungen (in Impulsen/15 s).

BL = Baseline-Aktivität. * $p < 0,05$ (Mann-Whitney-U-Test).

4.3. Untersuchung der Wirkung von L-745,337, Indometacin, Diclofenac und SC-560 bei etablierter spinaler Hyperexzitabilität

Die infolge der K/C-Injektion entstehende Übererregbarkeit spinaler Neurone erreicht nach 5-6 h ein Plateau, i.e. die Antworten steigen nach diesem Zeitraum in der Regel nicht weiter an (Neugebauer et al., 1993). Mit den im folgenden beschriebenen Experimenten wurde 6-8 h nach K/C-Injektion begonnen.

4.3.1. Effekt der spinalen und systemischen Applikation von L-745,337

4.3.1.1. Spinale Applikation

Nach Aufzeichnung der Baseline-Aktivität unter Einwirkung von Vehikel (Glukose 5%) wurde L-745,337 in zwei verschiedenen Konzentrationen auf das Rückenmark appliziert und die Reizantworten über 100 min beobachtet.

In den Kontrolltieren (n=6) mit bestehender Kniegelenkentzündung veränderten sich über die gesamte Versuchsdauer weder die Antworten auf Knie-, noch auf Sprunggelenk- oder Pfotenkompression. Wie aus Abbildung 7 ersichtlich, trat im Gegensatz dazu unter Einwirkung von L-745,337 auf das Rückenmark eine dosisabhängige Reduktion der Reizantworten ein. Die Wirkung von L-745,337 auf die Erregbarkeit der Hinterhornneurone war in der Regel schon bei der zweiten Reizung nach der spinalen Applikation erkennbar und äußerte sich in einem nahezu linearen Abfall der Antworten. Tabelle 4 enthält die Mittelwerte der Antworten vor und 85-100 min nach Applikation von L-745,337 bzw. Vehikel. Bei Vergleich der letzten 3 Antworten unter Einwirkung von L-745,337 mit der Baseline konnte der selektive COX-2-Inhibitor in einer Konzentration von 0,3 mM (n=7) die Entladung während noxischer Reizung am Knie im Mittel um 223 ± 122 Impulse/15 s senken, am Sprunggelenk um 160 ± 149 und an der Pfote um 77 ± 66 . Noch deutlicher war die Suppression der Antworten bei Applikation der 3 mM-Lösung (n=6). Hier fielen die Reizantworten um 529 ± 258 , 165 ± 200 bzw. 104 ± 53 Impulse/15 s ab. Die durch L-745,337 0,3 und 3 mM bewirkte Antwortreduktion war signifikant für die Reizung mit nicht-noxischer und noxischer Intensität an Knie und Sprunggelenk sowie für die noxische Reizung der Pfote ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangtest für gepaarte Stichproben).

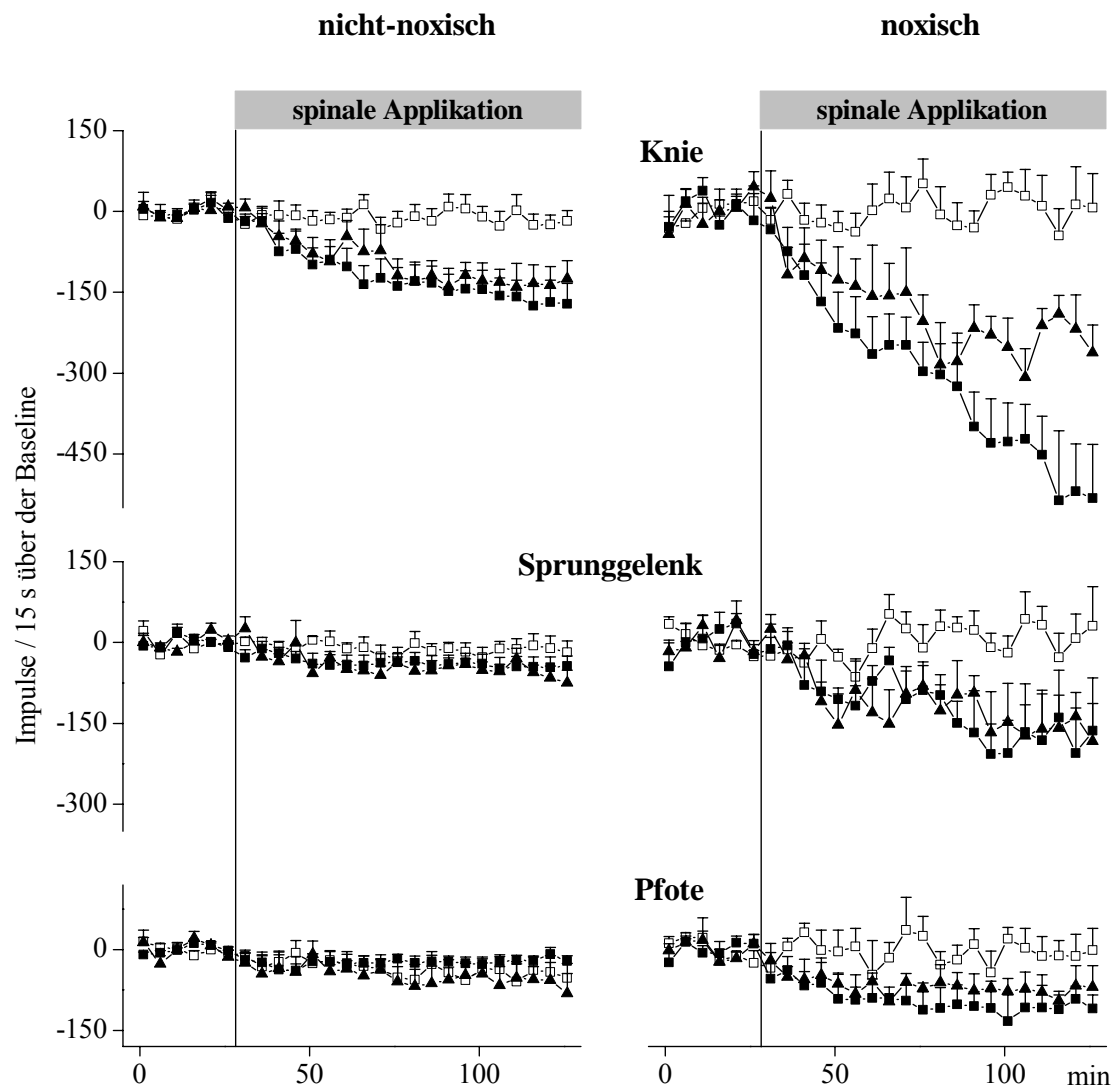


Abbildung 7: Effekt von L-745,337 0,3 mM (\blacktriangle , $n=7$), L-745,337 3 mM (\blacksquare , $n=6$) bzw. Vehikel (\square , $n=6$) auf das Antwortverhalten übererregbarer Hinterhornneurone im Zeitverlauf.

In den ersten 30 min befand sich nur das Vehikel im Rückenmarkspool (Baseline). Für die Darstellung wurden die normierten Reizantworten verwendet. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert \pm SEM der Antworten von jeweils 6 bzw. 7 Neuronen auf nicht-noxischen bzw. noxischen mechanischen Reiz an Knie, Sprunggelenk oder Pfote (in Impulsen/15 s).

Tabelle 4: Einfluß von L-745,337 in unterschiedlicher Dosierung bzw. Vehikel auf die neuronale Erregbarkeit bei etablierter Hyperexzitabilität.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Antworten (in Impulsen/15 s) 30-0 min vor und 85-100 min nach der spinalen Applikation von L-745,337 0,3 mM (n=7), 3 mM (n=6) bzw. Vehikel (n=6).

Stimulus	Kontrolle (Glukose 5%)		L-745,337 0,3 mM		L-745,337 3 mM	
	vor	nach	vor	nach	vor	nach
Knie:						
- nicht-noxisch	410 \pm 280	387 \pm 253	380 \pm 97	249 \pm 187	264 \pm 136	92 \pm 46
- noxisch	980 \pm 526	972 \pm 456	1118 \pm 165	917 \pm 442	1228 \pm 628	698 \pm 407
Sprunggelenk:						
- nicht-noxisch	181 \pm 157	167 \pm 160	117 \pm 38	43 \pm 48	82 \pm 115	37 \pm 82
- noxisch	595 \pm 259	598 \pm 233	563 \pm 133	371 \pm 197	889 \pm 285	724 \pm 205
Pfote:						
- nicht-noxisch	166 \pm 126	122 \pm 71	132 \pm 46	52 \pm 38	58 \pm 88	41 \pm 85
- noxisch	340 \pm 301	331 \pm 267	261 \pm 56	163 \pm 133	219 \pm 183	115 \pm 156

4.3.1.2. Systemische Gabe

Im Anschluß an die oben beschriebene Untersuchung wurde den mit L-745,337 3 mM bzw. Vehikel behandelten Tieren eine Dosis L-745,337 0,4 mg/kg KG intraperitoneal verabreicht und die Auswirkung der systemischen Gabe über 50 min beobachtet. Diese Fragestellung ist in Abbildung 8 abgehandelt. Bei den mit Vehikel behandelten Ratten verursachte die i.p.-Injektion einen schnellen und starken Abfall der Antworten. In der Versuchsgruppe mit L-745,337 auf der Rückenmarksoberfläche setzte sich nach der systemischen Dosis die gleichmäßige Reduktion der Antworten fort.

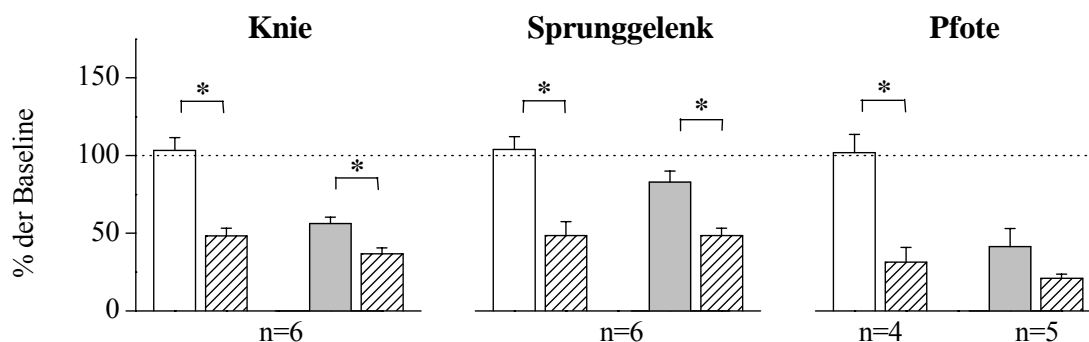


Abbildung 8: Effekt von L-745,337 bei spinaler und nachfolgender intraperitonealer Applikation bei etablierter Hyperexzitabilität.

Die Säulen stellen den Mittelwert der Antworten auf noxische Reize in % + SEM der mittleren Aktivität vor Substanzapplikation dar. Dabei wurden jeweils die Mittelwerte der letzten 3 Antworten der spinalen Applikation von Vehikel (weiße Säulen) bzw. L-745,337 (graue Säulen) den Mittelwerten der letzten 3 Antworten nach Verabreichung der intraperitonealen L-745,337-Dosis (schraffierte Säulen) gegenübergestellt. * $p < 0,05$, Wilcoxon-Rangtest für gepaarte Stichproben.

4.3.1.3. Spinale Applikation von L-745,337 über 200 min

Zusätzlich wurde an 4 Versuchstieren untersucht, ob die Wirkung von L-745,337 eine Sättigung erreicht bzw. wie weit die Aktivität der hyperexzitablen Nervenzellen unter der Anwesenheit des COX-2-Inhibitors absinkt. Die Antworten auf mechanische Reize wurden dafür über 200 min aufgezeichnet. Nachdem das Lösungsmittel (Glucose 5%) gegen L-745,337 3 mM ausgetauscht worden war, zeigte sich eine beständige Abnahme der Antwortpotentiale, ohne daß eine erkennbare Terminierung der Substanzwirkung in dieser Zeit auftrat (siehe Tab. 5). Am Sprunggelenk (n=4) ließen sich nach 100 min durch nicht-noxische Reize keine Antworten mehr hervorrufen und an der Pfote (n=2) konnte selbst der noxische Stimulus keine Antwortpotentiale mehr auslösen.

Tabelle 5: Effekt von spinalem L-745,337 bei bestehender Entzündung im Zeitverlauf.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aller Antworten in den entsprechenden Zeitintervallen (in Impulsen /15 s).

% der BL = Mittelwert \pm SD der 5 Antworten 175-200 min nach spinaler Applikation von L-745,337 in Prozent der Baseline

Stimulus	Baseline	L-745,337 3 mM (Applikationsdauer in min)				% der BL
		0-50	50-100	100-150	150-200	
Knie:						
- nicht-noxisch	276 \pm 89	202 \pm 67	116 \pm 41	63 \pm 23	34 \pm 14	10 \pm 3
- noxisch	1112 \pm 370	955 \pm 250	732 \pm 163	508 \pm 144	334 \pm 106	32 \pm 5
Sprunggelenk:						
- nicht-noxisch	45 \pm 24	15 \pm 13	3 \pm 4	2 \pm 2	0	0
- noxisch	388 \pm 184	301 \pm 165	179 \pm 117	93 \pm 73	44 \pm 35	11 \pm 6

4.3.2. Effekt von spinalem L-745,337 und der anschließenden simultanen Applikation von PGE₂ und L-745,337

In diesen Experimenten wurde untersucht, ob die Wirkung von L-745,337 bei etablierter Hyperexzitabilität durch die spinale Applikation von PGE₂ antagonisierbar ist. Bei 6 Tieren erfolgte nach Aufzeichnung der Baseline-Aktivität zunächst die Applikation von L-745,337 in einer Konzentration von 3 mM auf das Rückenmark. In den folgenden 100 min konnte eine rapide Abnahme der Antworten beobachtet werden, bei nicht-noxischer Knierreizung auf 40% der Aktivität vor L-745,337-Applikation, bei noxischer Knierreizung auf 60% und bei Reizung am Sprunggelenk auf 17% bzw. 47% (Abb. 9B, grauen Säulen). Bei 3 von 4 Neuronen, deren rezeptives Feld sich vor der Applikation von L-745,337 bis auf die Pfote erstreckt hatte, waren durch mechanische Reize keine Antwortpotentiale mehr auslösbar. Anschließend wurden zu der L-745,337-Lösung im Rückenmarkpool 30 µl einer PGE₂ enthaltenden Lösung (100 ng/µl) gegeben.

Unter Einwirkung von L-745,337 und PGE₂ stiegen die Antworten der Rückenmarkneurone auf mechanische Reizung an Sprunggelenk und Pfote an. Dieser Anstieg war signifikant für die Kompression des Sprunggelenkes ($p < 0,05$, Wilcoxon-Rangtest für gepaarte Stichproben). Wie in Abbildung 9 erkennbar, löste die noxische Stimulation an Sprunggelenk und Pfote 1 h nach der simultanen Applikation von PGE₂ und L-745,337 in etwa Antwortstärken wie vor der alleinigen Applikation von L-745,337 aus.

Unter der gleichzeitigen Anwendung von PGE₂ und L-745,337 kam es nicht zu einer weiteren Reduktion der Antworten auf Reizung am Knie. Im Gegensatz zu den beobachteten Veränderungen des Antwortverhaltens bei Sprunggelenk- und Pfotenreizung zeigte sich am Knie keine wesentliche Zunahme der Reizantworten.

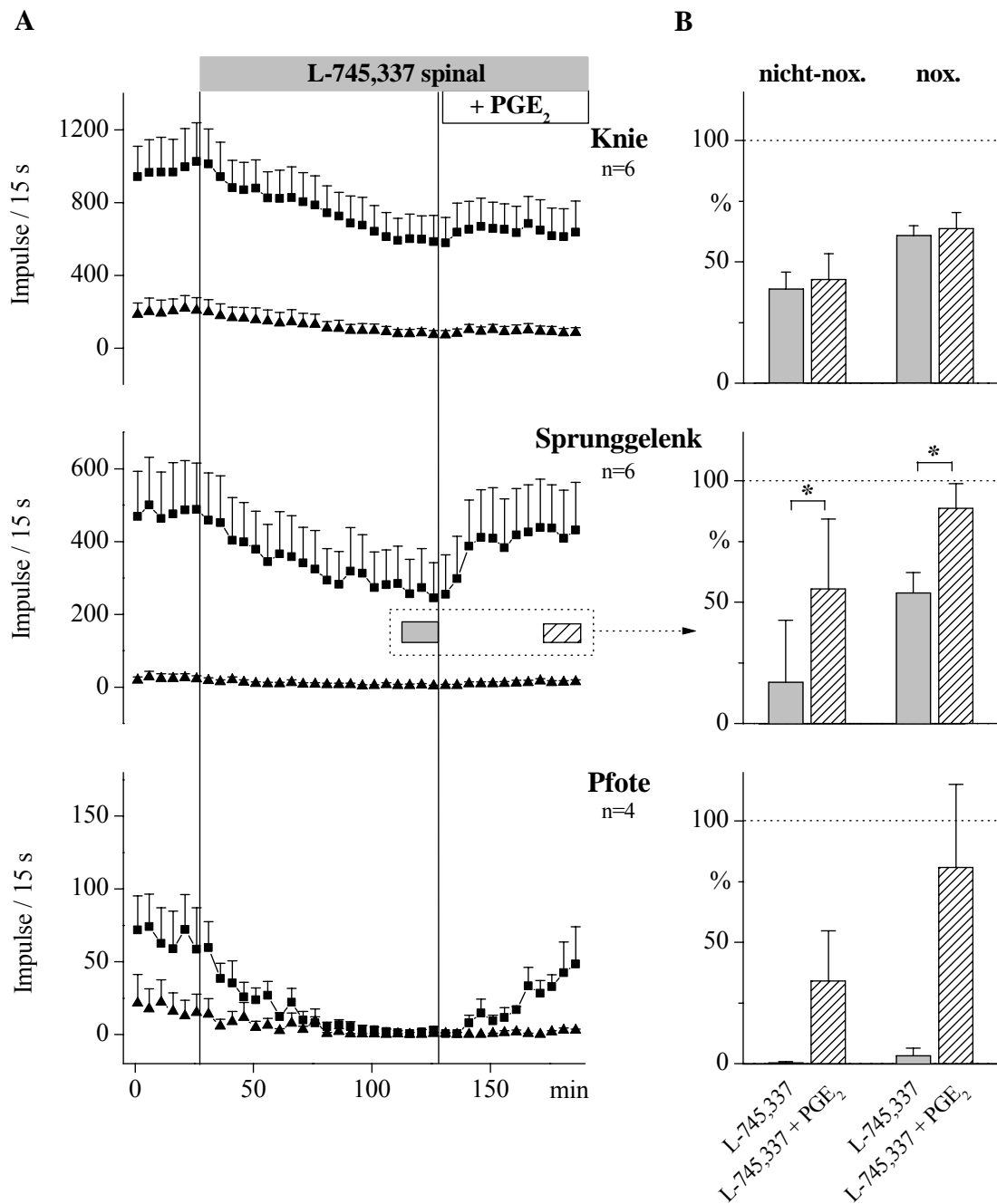


Abbildung 9: Auswirkung von spinalem L-745,337 und der anschließenden simultanen Applikation von PGE₂ und L-745,337 auf das Antwortverhalten übererregbarer Hinterhornneurone

A) mittlere Antworten + SEM von 4-6 Neuronen auf nicht-noxische (▲) und noxische (■) Reizung an Knie, Sprunggelenk und Pfote im Zeitverlauf. In den ersten 30 min befand sich nur das Vehikel (Glukose 5%) auf dem Rückenmark

B) Mittelwert + SEM der letzten 3 Antworten unter Einwirkung L-745,337 (graue Säulen) im Vergleich zu den letzten 3 Antworten unter L-745,337 + PGE₂ (schraffierte Säulen) in % der Baseline für nicht-noxische bzw. noxische Reizintensitäten

* $p < 0,05$, Wilcoxon-Rangtest für gepaarte Stichproben.

4.3.3. Effekt der spinalen und systemischen Applikation von SC-560

Ziel dieser Experimente war die Klärung der Rolle des Isoenzymes COX-1 bei der Aufrechterhaltung der durch den peripheren Entzündungsreiz entstandenen zentralen Sensibilisierung. Unter dieser Fragestellung wurde nach der Bestimmung der Baseline-Aktivität mit dem Vehikel (DMF 50% in aqua dest.) SC-560 auf das Rückenmark gegeben. Spinal appliziertes SC-560 beeinflusste in einer Konzentration von 3mM die Antworten auf mechanische Stimulation nicht. Wie aus Abbildung 10 ersichtlich, blieb die Anzahl der durch Kompression evozierten Aktionspotentiale über den Zeitraum von 60 min sowohl am entzündeten Knie (n=7), als auch an Sprunggelenk (n=7) und Pfote (n=3) nahezu konstant. Nach der intraperitonealen Gabe von SC-560 (1 mg/kg KG) hingegen zeigte sich eine progressive Abnahme der Antworten. Die Reduktion war statistisch signifikant für noxische und nicht-noxische Reize an Knie und Sprunggelenk bei Vergleich der letzten 3 Antworten vor und der letzten 3 Antworten nach intraperitonealer SC-560-Injektion ($p < 0,05$, Wilcoxon-Rangtest für gepaarte Stichproben).

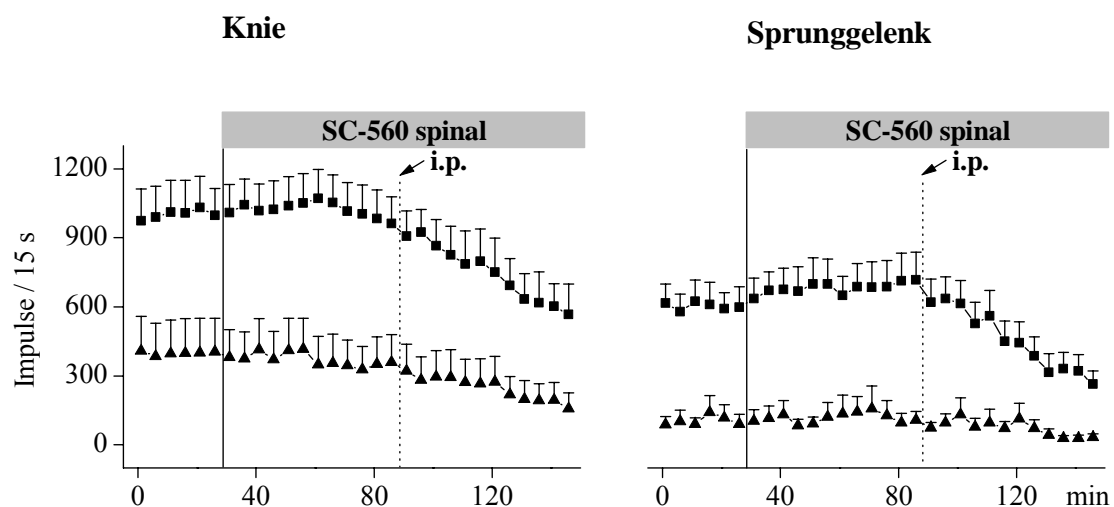


Abbildung 10: Effekt der spinalen und systemischen (i.p.) Applikation von SC-560 auf das Antwortverhalten übererregbarer nozizeptiver Hinterhornneurone. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert + SEM der Antworten von 7 Neuronen auf nicht-noxische (▲) bzw. noxische (■) Knie- oder Sprunggelenkstimulation (in Impulsen/15 s)

4.3.4. Effekt der spinalen Applikation von Indometacin und Diclofenac

Um die spinale Wirkung nicht-selektiver COX-Inhibitoren bei bestehender Hyperexzitabilität zu testen, wurde exemplarisch 3 Tieren mit entzündetem Kniegelenk nach der Bestimmung der Baseline-Aktivität über 30 min Indometacin in einer Konzentration von 8 mM und weiteren 6 Tieren Diclofenac 3 mM spinal appliziert. Eine Veränderung des Antwortverhaltens nozizeptiver Rückenmarkneurone war unter dem Einfluß dieser Wirkstoffe innerhalb eines Zeitraumes von 60 Minuten nicht feststellbar (Abb. 11). Die anschließende Applikation der 3 mM L-745-Lösung hingegen führte innerhalb von 60 min zu einer Reduktion der Antworten auf mechanische Stimuli an Knie, Sprunggelenk und Pfote. Diese Reduktion war signifikant für die noxische Reizung an Knie und Sprunggelenk in der Diclofenac-Gruppe, nicht jedoch für Indometacin aufgrund der geringen Fallzahl ($p < 0,05$, Wilcoxon-Rangtest für gepaarte Stichproben).

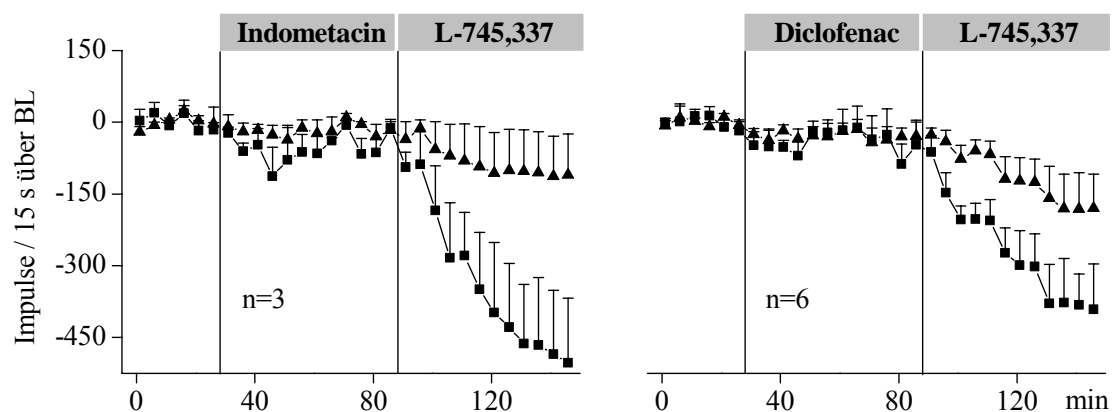


Abbildung 11: Effekt von spinalem Indometacin bzw. Diclofenac auf die neuronalen Antworten auf nicht-noxische (▲) und noxische (■) Stimulation am Knie nach entstandener Übererregbarkeit, sowie Einfluß anschließender L-745,337-Applikation.

Für die Abbildung wurden die normierten Antworten verwendet, i.e. jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert + SEM der Antworten (in Impulsen/15 s) auf Kniereizung nach Abzug der mittleren Aktivität vor Substanzapplikation. Während der ersten 30 min befand sich nur das Vehikel auf dem Rückenmark.

4.3.5. Effekt der spinalen Applikation von SC-560 in Kombination mit L-745,337

Gegenstand dieses Experimentes war die Frage, wie sich bei etablierter Hyperexzitabilität die zeitgleiche Hemmung von COX-1 und COX-2 durch L-745,337 und SC-560 auf die neuronalen Antworten auswirkt. Von dieser Kombination wurde im Gegensatz zu den nicht-selektiven NSAIDs eine sichere COX-2-inhibitorische Wirkung angenommen.

Die in den vorherigen Experimenten verwendeten Lösungen von L-745,337 3 mM (in 5%-iger Glukoselösung) und von SC-560 3 mM (in DMF 50% in aqua dest.) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Eine höhere Konzentrierung der Substanzen war aufgrund ihrer geringen Löslichkeit nicht möglich. Die zuverlässige Wirksamkeit von L-745,337 ist aber auch in niedrigeren Konzentrationsbereichen (0,3 mM), wie unter 3.3.1. beschrieben, bekannt. Bei 6 Tieren wurde nach Aufzeichnung der Baseline die Lösung mit jeweils 1,5 mM SC-560 und L-745,337 auf das Rückenmark gegeben. Über 100 min zeigte sich keine Veränderung der Antworten auf nicht-noxische und noxische Reizung an Knie (n=6), Sprunggelenk (n=6) und Pfote (n=2). Nachdem im Anschluß das Substanzgemisch vom Rückenmark entfernt und gegen L-745,337 1,5 mM (in Glukose 5%) ausgetauscht worden war, kam es bei jedem der 6 Neurone zu einer Reduktion der Antwortstärke. Abbildung 12 illustriert dies eindrücklich. Signifikanz bestand für beide Intensitäten an Knie und Sprunggelenk bei Vergleich der letzten 3 Werte unter simultaner Anwendung von SC-560 und L-745,337 mit den letzten 3 Werten der alleinigen L-745,337-Applikation ($p < 0,05$, Wilcoxon-Rangtest für gepaarte Stichproben).

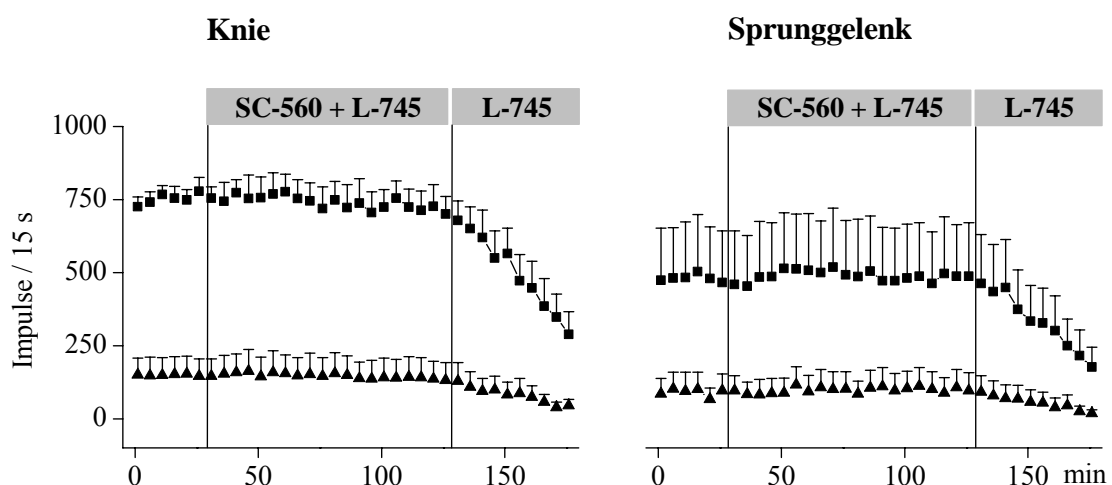


Abbildung 12: Effekt der simultanen Anwendung von L-745,337 und SC-560 mit nachfolgender alleiniger Applikation von L-745,337 auf das Rückenmark.

Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert + SEM der Antworten von 6 Neuronen auf nicht-noxische (▲) und noxische (■) Reizung von Knie bzw. Sprunggelenk.

4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Modell der Kaolin / Carrageenan-induzierten Arthritis konnte die spinale Applikation des selektiven COX-2-Inhibitors L-745,337 einerseits die Entstehung entzündungsinduzierter spinaler Hyperexzitabilität vollständig verhindern. Auf der anderen Seite reduzierte sie dosisabhängig die Antworten nozizeptiver Hinterhornneurone auf mechanische Reize, wenn diese Neurone durch die Entzündung bereits sensibilisiert waren. Die Reduktion der Antworten wurde durch die gleichzeitige spinale Applikation von PGE₂ terminiert und zumindest teilweise aufgehoben. Unter Einwirkung des selektiven COX-1-Hemmers SC-560 vor und während der Entstehung einer Entzündung im Kniegelenk wurde in den ersten zwei Stunden nach K/C-Injektion die Aktivitätszunahme der neuronalen Antworten komplett unterdrückt. Danach stiegen die Antworten jedoch rasch an und vier Stunden nach Induktion der Entzündung war kein Unterschied zu den unbehandelten Kontrolltieren mehr nachweisbar. Bei etablierter Hyperexzitabilität der Rückenmarkneurone konnten spinal appliziertes SC-560 sowie auch die nicht-selektiven COX-Inhibitoren Indometacin und Diclofenac die Antworten auf mechanische Reize nicht beeinflussen. Interessanterweise trat auch während der zeitgleichen spinalen Applikation von L-745,337 und SC-560 keine Veränderung des Antwortverhaltens hyperexzitabler Hinterhornneurone auf. Während einer etablierten Kniegelenkentzündung reduzierte die intraperitoneale Injektion sowohl von L-745,337 als auch von SC-560 die Reizantworten.

Im Entzündungsverlauf wirken sich demzufolge selektive COX-2- und nicht-selektive COX-1/COX-2- bzw. COX-1-Hemmung unterschiedlich aus. Der selektive COX-2-Inhibitor L-745,337 reduziert sowohl während der Entstehung als auch bei etablierter spinaler Hyperexzitabilität äußerst wirkungsvoll die neuronalen Antworten auf mechanische Reize. Der selektive COX-1-Hemmer ist hingegen nur in einem begrenzten Zeitraum nach K/C-Injektion wirksam und führt wie auch die nicht-selektiven COX-Inhibitoren bei bestehender zentraler Sensibilisierung nicht zu einer Abnahme der Reizantworten.

5. DISKUSSION

5.1. Methodische Überlegungen

5.1.1. Präparation und Narkose

Der Versuchsaufbau bedingt zum einen die Durchführung der Experimente unter Allgemeinanästhesie sowie eine umfassende chirurgische Intervention. Verschiedene Autoren weisen darauf hin, daß die Tiefe der Anästhesie und die durchgeführte Operation an sich einen profunden Effekt auf die Erregbarkeit spinaler Strukturen haben können (Clarke & Matthews, 1990; Hartell & Headley, 1990, 1991). Um den Einfluß von Thiopental auf die Antworten der Hinterhornneurone zu minimieren, gleichzeitig aber eine Wirkungskumulation des Anästhetikums zu vermeiden, wurde die Tiefe der Narkose regelmäßig überprüft (siehe Abschnitt 2.2.1.) und in Abständen von 30-60 min geringe Dosen Thiopental nachappliziert. Dennoch ist eine anteilige Beeinflussung der neuronalen Antworten durch fluktuierende Thiopental-Plasmakonzentrationen nicht auszuschließen.

Die chirurgische Präparation erfolgte bei jedem Tier so atraumatisch wie möglich unter Schonung angrenzender Strukturen und Vermeidung von Blutverlusten. Bei den Tieren ohne Kniegelenkentzündung konnte eine Beeinflussung der Reizantworten durch L-745,337 bzw. SC-560 nicht festgestellt werden. Dies impliziert, daß die präparationsbedingte traumatische Schädigung die Erregbarkeit der Hinterhornneurone nicht wesentlich beeinflusst. Falls dennoch eine Sensibilisierung stattfindet, scheint diese nicht durch COX-Produkte vermittelt zu werden. Ein möglicher Einfluß der Präparation bzw. der Narkose auf die neuronale Erregbarkeit verfälscht die Ergebnisse jedoch nicht, da die Versuchstiere in allen Gruppen der gleichen Behandlung unterzogen wurden.

5.1.2. Mechanische Reizung

Die mechanische Reizung von Knie, Sprunggelenk und Pfote erfolgte in zwei standardisierten Intensitäten mittels geeichter Vorrichtungen (siehe Abschnitt 2.4.1.). Bei der Durchführung der Reizung wurde darauf geachtet, die Kompressionsreize immer an derselben Stelle zu setzen. Durch die Entwicklung der entzündungsbedingten Ergußbildung im Kniegelenk ist allerdings nicht auszuschließen, daß leichte Abweichungen der Extremitätenposition in der

Haltevorrichtung zu einer veränderten Druckverteilung im Gelenk und damit zu geringen Unterschieden in den Reizantworten führten.

Die Antworten der Hinterhornneurone stabilisierten sich bei rhythmischer Reizung nach einiger Zeit. Das heißt, die ersten 3-4 Reizserien lösten im Regelfall stärkere Antworten aus, danach pendelte sich die Anzahl der ausgelösten Antwortpotentiale auf ein gleichbleibendes niedrigeres Niveau ein. Während der Induktion der Entzündung durch die Injektion von Kaolin und Carrageenan wurden über 30 min keine mechanischen Stimuli appliziert. Die Antworten unmittelbar nach dieser Phase waren unabhängig von der spinal applizierten Substanz stärker als die zuvor registrierte Baseline-Aktivität (siehe Abb. 5 und 6). Nach unserer Auffassung ist diese initiale Zunahme der Antwortstärke durch die Stimulationspause bedingt und nicht der Substanzwirkung oder der Übererregbarkeitsentwicklung im Entzündungsverlauf zuzuschreiben.

5.1.3. Selektivität der Testsubstanzen

Ziel der Experimente war die Auswirkung einer selektiven Blockade der spinalen Isoenzyme COX-1 bzw. COX-2 im Hinterhorn während des Entzündungsverlaufes zu testen. Die Auswahl geeigneter Wirkstoffe für diese Experimente richtete sich nach der Selektivität der inhibitorischen Aktivität und danach, ob der Wirkstoff in einem für die spinale Applikation geeigneten Lösungsmittel dispensiert werden konnte.

Die Bestimmung der relativen inhibitorischen Aktivität erfolgt in verschiedenen experimentellen Modellen. Es existieren In-vitro-Teste, in denen die Hemmung der COX-Aktivität unter Verwendung von rekombinanten COX-Enzymen, isolierten Zellreihen, die selektiv entweder die COX-1 oder die COX-2 exprimieren, oder Blutzellen (Monozyten, Thrombozyten) ermittelt wird. Das Ausmaß der COX-1- und COX-2-Inhibition in vivo kann jedoch nur bedingt aus diesen Daten abgeleitet werden (Pairet & van Ryn, 1998):

- **SC-560:** selektiver COX-1-Hemmer, der die COX-1 etwa 1000-fach potenter als die COX-2 inhibiert. Die halbmaximale Inhibition der Enzymaktivität (IC_{50}) im COX-Enzym Assay wurde durch eine Konzentration von 0,009 μM für COX-1 und von 6,3 μM für COX-2 erreicht (Smith, CJ et al., 1998).

- **L-745,337**: selektiver COX-2-Hemmer, der ungefähr 1000-fach potenter die COX-2 als die COX-1 inhibiert, wobei die Angaben zwischen den Autoren und den verwendeten Methoden variieren (Cromlish & Kennedy, 1996; Patrignani et al., 1997; Riendeau et al., 1997). Beispielsweise betrug die COX-1 $IC_{50} > 10 \mu M$ und die COX-2 $IC_{50} 23 \pm 8 nM$ für die arachidonsäureinduzierte PGE_2 -Produktion in isolierten Tumorzelllinien (Chan et al., 1995)
- **Indometacin**: nicht-selektiver COX-Hemmer, dessen IC_{50} in COX-Enzym-Assays ca. 10 mal geringer für die Inhibition der COX-1 als für die der COX-2 (Chan et al., 1995; Gierse et al., 1995; Cromlish & Kennedy, 1996) ist
- **Diclofenac**: nicht-selektiver COX-Hemmer (O'Neill et al., 1994; Patrignani et al., 1997; Riendeau et al., 1997), der im Vollblut-Assay die monozytäre COX-2 etwa 10-20-fach potenter hemmt als die thrombozytäre COX-1 (Patrignani et al., 1997)

Insbesondere durch die sehr unterschiedliche Löslichkeit ist unklar, wieweit die direkt auf das Rückenmark applizierten NSAID-Konzentrationen den durch systemische Applikation erreichten Konzentrationen im spinalen Gewebe entsprechen.

5.2. Charakterisierung der untersuchten Neurone

In den Experimenten sollte eine Population von Rückenmarkneuronen mit Afferenz aus dem Kniegelenk untersucht werden, die an der Nozizeption bei Arthritis beteiligt ist. Die Zielneurone der nozizeptiven Primärafferenzen im Rückenmark sind zum großen Teil Neurone, die konvergenten nozizeptiven Einstrom aus Gelenk und Haut oder Muskulatur erhalten (Schaible et al., 1987a). Durch intensive Testung des Aktivierungsverhaltens der Neurone (siehe Abschnitt 2.2.5.) wurden solche identifiziert, die auf noxischen Kompressionsreiz am Knie antworteten und kein kutanes rezeptives Feld über dem Kniegelenk besaßen. Auf diese Weise wurde sichergestellt, daß die Hinterhornneurone auch tatsächlich Afferenzen aus dem Gelenk und damit dem entzündeten Areal erhalten.

Der größte Anteil der Neurone mit nozizeptiver Afferenz aus dem Kniegelenk war im tiefen Hinterhorn lokalisiert, wobei hinsichtlich der Tiefenlokalisation kein Unterschied zwischen WDR- und HT-Neuronen bestand. Die Genauigkeit der Tiefenlokalisation durch Mikrometerantrieb des Schrittmotors wurde von anderen Arbeitsgruppen durch den Vergleich mit der histologischen Auswertung nach Farbstoffinjektion belegt (Neugebauer & Schaible,

1988, 1990; Grubb et al., 1993). Voraussetzung ist eine exakte Positionierung der Elektrode auf der Rückenmarksoberfläche vor dem Einstechen in das Gewebe. Neurone mit Kniegelenkeingang waren in den Laminae IV-VI am häufigsten. Dies könnte auf die besondere Bedeutung dieser Laminae für die Verarbeitung nozizeptiver Informationen aus dem Kniegelenk bzw. tiefer Gewebestrukturen allgemein zurückzuführen sein, die Schaible et al. 1987 schon hervorgehoben haben. Dabei muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß auch in oberflächlichen Schichten (v.a. Lamina I) des Hinterhornes eine Vielzahl nozizeptivspezifischer Zellen lokalisiert werden konnte. Da diese jedoch häufig ebenfalls durch die Haut über dem Kniegelenk erregbar waren oder die Diskrimination der Spikes aufgrund der hohen Zellzahl mit rein taktilem Input nicht möglich war, wurden Neurone in den tieferen Schichten bevorzugt. In früheren Studien an Ratten wurden bei der Untersuchung von nozizeptiven Rückenmarkneuronen mit Afferenz aus dem Kniegelenk (Neugebauer et al., 1996) oder dem Sprunggelenk (Grubb et al., 1993) aus ähnlichen Gründen v.a. Neurone aus dem tiefen Hinterhorn abgeleitet.

Die Ursprungszellen des Tractus spinothalamicus, des wichtigsten aber nicht alleinigen Nervenfasers tranges für die Weiterleitung nozizeptiver Information an supraspinale Strukturen, sind vorwiegend in den Laminae I und V-VII (Lima, 1997) lokalisiert. Da in der vorliegenden Arbeit auch Neurone aus anderen Laminae abgeleitet wurden und die Gruppe der Nervenzellen mit Faserprojektionen zum Gehirn nur schätzungsweise ein Prozent der gesamten Nervenzellen im Rückenmark ausmacht, kann geschlußfolgert werden, daß es sich bei den abgeleiteten Neuronen vorwiegend um Interneurone handelte. Aufgrund der Tatsache, daß der Zeitverlauf der Änderungen des Antwortverhaltens der Hinterhornneurone mit Beobachtungen aus Verhaltensexperimenten übereinstimmt, in denen die Versuchstiere etwa eine Stunde nach der Injektion von Kaolin und Carrageenan unmißverständliche Schmerzreaktionen (Vokalisation, Schonhaltung der betroffenen Extremität, Hyperalgesie etc.) zeigten (van Arman et al., 1970; Brune & Glatt, 1974; Sluka & Westlund, 1993), ist anzunehmen, daß wenigstens ein Teil dieser Neurone mit Strukturen in Verbindung steht, die zur bewußten Wahrnehmung von Schmerzempfindungen beitragen.

5.3. Wirkung der spinalen Applikation von COX-Inhibitoren

5.3.1. Effekt von spinalem L-745,337 und SC-560 im nicht entzündeten Tier

Im nativen Tier kam es während der spinalen Applikation von L-745,337 und SC-560 über einen Zeitraum von 30 min zu keiner Änderung der neuronalen Antworten auf nicht-noxischen und noxischen Druckreiz. Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen aus Verhaltensstudien, in denen die intrathekale Applikation nicht-selektiver und selektiver NSAIDs keine Veränderung der Schmerzschwellen für noxische thermische (Yamamoto & Nozaki-Taguchi, 1996, 1997) oder mechanische (Powell et al., 1999) Reize hervorrief. Gleichfalls konnte die spinale Applikation von Indometacin oder Meclofenamidsäure die Antworten von Hinterhornneuronen auf noxische Kompressionsreize oder die Flexor-Reflexantwort auf intermittierende niedrigfrequente C-Faser-Reizung nicht beeinflussen (Willingale et al., 1997; Vasquez et al., 2001). Die in diesen Studien angewandten Reize führen wahrscheinlich nicht zu einer zentralen Sensibilisierung. Dagegen war beispielsweise die Potenzierung des Wegziehreflexes durch repetitive elektrische Reizung des Nervus suralis mit einer Frequenz von 1 Hz für die Inhibition durch Indometacin und SC-58125 suszeptibel (Willingale et al., 1997).

Die Interpretation dieser Ergebnisse ist vor dem Hintergrund der konstitutiven Expression von COX-1 und COX-2 im Rückenmark und nachweisbarer basaler Prostaglandinspiegel im Liquor schwierig. Vermutlich sind aber COX-1/COX-2 und damit ihre Produkte unter normalen Bedingungen nicht in die Transmission nozizeptiver Informationen involviert bzw. ihr Beitrag zur Effektivität der synaptischen Übertragung von Input aus gesundem Gewebe zu gering, um mit den angewendeten Methoden erfaßt zu werden. Bei Einwirkung entzündlicher Reize bzw. nicht-inflammatorischer noxischer Stimuli, die eine ausreichend starke Aktivierung afferenter C-Fasern hervorrufen, scheinen Prostaglandine an der Regulation von Mechanismen beteiligt zu sein, die zu einer Sensibilisierung spinaler Neurone beitragen können (Vanegas & Schaible, 2001; Svensson & Yaksh, 2002).

5.3.2. Effekt von spinalem L-745,337 und SC-560 während der Entstehung spinaler Hyperexzitabilität

Nach der Injektion von Kaolin und Carrageenan zeigten die nozizeptiven Neurone im Hinterhorn typische Veränderungen ihres Entladungsverhaltens. Nicht nur die mechanische Reizung des entzündeten Gewebes erzeugte sehr viel stärkere Antworten, sondern auch durch Stimulation von entfernten gesunden Bezirken konnten gesteigerte bzw. zusätzliche Antworten ausgelöst werden. In HT-Neuronen, die zuvor durch nicht-noxische Reize nicht erregbar waren, trat zudem eine Senkung der Erregungsschwelle ein. Diese Veränderungen im Antwortverhalten spinaler Neurone sind vermutlich Teil der zentralen neuronalen Mechanismen, die zur Ausprägung von Allodynie, primärer und sekundärer mechanischer Hyperalgesie in der Peripherie beitragen. Sie sind neben der lokalen Sensibilisierung peripherer Nozizeptoren entscheidend an der Generierung von Schmerzen während einer Entzündung beteiligt (Woolf, 1983; Neugebauer & Schaible, 1990; Dougherty et al., 1992).

Ähnliche Veränderungen des neuronalen Antwortverhaltens können durch die topische Applikation von PGE₂ auf das Rückenmark ausgelöst werden (Vasquez et al., 2001; Turnbach et al., 2002). PGE₂ verstärkt die Antworten nozizeptiver Rückenmarkneurone auf mechanische Reize und kann sogar zu einer Ausdehnung des rezeptiven Feldes dieser Neurone führen (Vasquez et al., 2001). Den immanenten Beitrag von PGE₂ zur Entstehung zentraler Sensibilisierung belegen zudem Verhaltensexperimente, in denen die intrathekale Injektion von PGE₂ über implantierte Mikrodialysekatheter in wachen Tieren Allodynie und Hyperalgesie erzeugte (Taiwo & Levine, 1988; Uda et al., 1990; Minami et al., 1994a; Minami et al., 1994b; Ferreira & Lorenzetti, 1996; Minami et al., 1996).

Die spinale Applikation des selektiven COX-2-Inhibitors L-745,337 in einer Konzentration von 3 mM vor und während der Induktion einer akuten Monoarthritis im Kniegelenk konnte die Entstehung entzündungsinduzierter spinaler Hyperexzitabilität vollständig unterdrücken. Die Neurone zeigten nach K/C-Injektion keine Ausdehnung ihres rezeptiven Feldes und keine Absenkung der Erregungsschwellen, i.e. nicht-noxische Reize blieben weiterhin unerschwellig. Die Antworten bei Reizung mit noxischer Intensität nahmen nicht progressiv zu, am Kniegelenk löste die noxische Reizung geringere Antworten als vor Entzündungsinduktion aus. Die ausgeprägte Wirkung des COX-2-Hemmers überraschte, da spinal appliziertes Indometacin im gleichen Versuchsaufbau die Entwicklung von Übererregbarkeit in spinalen Neuronen verglichen mit den unbehandelten Kontrolltieren signifikant abschwächen, nicht aber vollständig verhindern konnte (Vasquez et al., 2001).

Trotz der verwendeten hohen Indometacin-Konzentration von 8 mM nahmen die Antworten auf noxische mechanische Reizung des entzündeten Kniegelenkes im Vergleich zu den Antworten vor K/C-Injektion signifikant zu.

Die Wirksamkeit selektiver COX-2-Hemmer und nicht-selektiver NSAIDs bei prophylaktischer spinaler Applikation ist von zahlreichen Arbeitsgruppen vor allem in Verhaltensexperimenten belegt worden. Yaksh et al. zeigten, daß selektive COX-2-Inhibitoren wie SC-58125, SC-236 und SC-384 die Entstehung thermischer Hyperalgesie durch subkutane Carrageenan-Injektion bzw. intrathekale NMDA- und Substanz P-Applikation verhindern können (Yaksh et al., 2001). Die intrathekale Applikation einer Reihe von COX-Inhibitoren unterschiedlicher Selektivität (ASS, Ibuprofen, Indometacin, Ketorolac, Zomepirac, Flurbiprofen, Celecoxib, NS-398) unterdrückte das Schmerzverhalten in der zweiten Phase des Formalin-Testes (Malmberg & Yaksh, 1992a; Yamamoto & Nozaki-Taguchi, 1996, 2002), welche als Modell für die Untersuchung persistierender Nozizeption und zentraler Sensibilisierung dient. Sie verhinderten zudem die Formalin-induzierte Freisetzung von PGE₂ und exzitatorischen Aminosäuren im Rückenmark (Malmberg & Yaksh, 1995a). Die Entwicklung taktiler Allodynie und thermischer Hyperalgesie nach Gewebequetschung bzw. intrathekaler Applikation von NMDA wurde durch SC-58125 nahezu vollständig verhindert (Ghilardi et al., 2004). Da der COX-2-Inhibitor auch die Freisetzung von Substanz P aus Primärafferenzen und die Induktion des „immediate early“-Genes c-Fos in spinalen Neuronen signifikant abschwächte, schlussfolgerten Ghilardi et al. aus ihren Beobachtungen, daß Produkte der konstitutiv vorhandenen spinalen COX-2 entscheidend an der Entwicklung zentraler Sensibilisierung nach Gewebeschädigung beteiligt sind und daß die COX-2-Hemmung diese neuronale Aktivierung im Rückenmark effektiv unterbinden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde außerdem die Auswirkung der spinalen Applikation von SC-560 auf die neuronalen Antworten im Entzündungsverlauf untersucht. In den ersten 2 h nach der Injektion von K/C unterdrückte der selektive COX-1-Inhibitor die Aktivitätszunahme der Hinterhornneurone ähnlich wie L-745,337, danach stiegen die Antworten jedoch auf das Niveau der Kontrollgruppe an. Vier Stunden nach K/C-Injektion war kein Unterschied zu den unbehandelten Tieren mehr feststellbar. In Verhaltensexperimenten wurde dieser zeitlich begrenzte Einfluß der COX-1-Hemmung auf die Entstehung entzündungsassoziierten Schmerzverhaltens bisher nicht beobachtet. Weder nach Formalin- (Yamamoto & Nozaki-Taguchi, 2002) oder Carrageenan-Injektion (Yaksh et

al., 2001), noch nach Weichteilschädigung durch Gewebequetschung (Ghilardi et al., 2004) konnte die intrathekale Applikation von SC-560 die Entwicklung von Hyperalgesie und Allodynie verzögern bzw. verhindern. Yaksh et al. begannen allerdings erst 2 h nach der Injektion von Carrageenan mit den Messungen und beobachteten folglich nicht den Zeitraum, in dem wir eine Wirkung von SC-560 feststellen konnten.

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse aus diesen Verhaltensexperimenten und der extrazellulären Ableitung einzelner nozizeptiver Hinterhornneurone kann aufgrund der Unterschiedlichkeit der Methodik einerseits und der verwendeten gewebsschädigenden Stimuli andererseits nicht gezogen werden. In Verhaltensstudien werden nozizeptive Reflexbögen und damit die Summe neuronaler Aktivität im sensorischen Hinterhorn und motorischen Vorderhorn untersucht. Eine Wirkung der COX-Inhibitoren im Vorderhorn ist durchaus denkbar, da in Motoneuronen des Vorderhornes ebenfalls starke COX-Immunreaktivität detektiert wurde (Goppelt-Strube & Beiche, 1997; Willingale et al., 1997; Beiche et al., 1998b; Ghilardi et al., 2004). Ob und in welchem Ausmaß die Effekte der COX-Inhibitoren auf einer Beeinflussung der motorischen oder der sensorischen Komponente des Reflexbogens beruhen, kann in Verhaltensexperimenten nicht differenziert werden. Eine unterschiedliche Beeinflussung der Teilstrukturen dieses Systems durch die Produkte der COX-1 könnte als Ursache der divergierenden Ergebnisse in Betracht kommen.

Welche Erklärung gibt es für die Wirkung von L-745,337 und SC-560?

Sowohl COX-1 als auch COX-2 werden im Rückenmark konstitutiv exprimiert. Die Injektion von K/C in das Kniegelenk induziert innerhalb weniger Minuten einen starken initialen Anstieg der spinalen extrazellulären Konzentration von PGE_2 , exzitatorischen Aminosäuren (Glutamat, Aspartat) und Citrullin (Marker für die NO-Produktion) in der Perfusatlösung (Yang et al., 1996a). PGE_2 fällt dann zunächst auf Baselinewerte ab um anschließend während sich die Entzündung in der Peripherie entwickelt, wie in PGE_2 -Antikörper-Mikroproben-Bestimmung nach 5 bzw. 9 h festgestellt werden konnte (Ebersberger et al., 1999), langsam anzusteigen. Der initiale rasche Anstieg von PGE_2 nach K/C-Injektion schließt eine Beteiligung der de-novo-Synthese von COX-Enzymen aus und scheint vielmehr durch die verstärkte Aktivierung bereits konstitutiv vorhandener COX-Moleküle ausgelöst zu werden. Durch entzündliche Stimuli erfolgt nahezu ausschließlich eine Induktion der COX-2 (Vanegas & Schaible, 2001; Svensson & Yaksh, 2002). Nachweisbare Veränderungen der mRNA- bzw. Protein-Expression dieses Isoenzymes treten in der Peripherie allerdings frühestens 30 min nach einem entzündlichen Stimulus auf, eine substantielle Induktion ist erst

nach 3 h meßbar (Seibert et al., 1994). Im Rückenmark wird ein ähnlicher Zeitverlauf der COX-2-Induktion angenommen, obwohl die Bestimmung von COX-2 mRNA bzw. Protein frühestens 3 h nach der Injektion von K/C bzw. CFA durchgeführt wurde (Beiche et al., 1996; Ebersberger et al., 1999). In der frühen Phase, i.e. in den ersten 2 h nach K/C-Injektion, trägt somit eher eine Aktivitätssteigerung der konstitutiv vorhandenen COX-1 und COX-2 zur Prostaglandinproduktion und damit zur Entstehung der spinalen Hyperexzitabilität bei.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann argumentiert werden, daß L-745,337 und SC-560 suffizient Effekte blockieren, die durch die gesteigerte Produktion von Prostaglandinen im Rückenmark während einer peripheren Entzündung hervorgerufen werden. Da zwischen SC-560 und L-745,337 kein Unterschied im Ausmaß der Inhibition feststellbar war, ist anzunehmen, daß beide Isoenzyme in der Frühphase der Entzündung in gleichen Anteilen zur Synthese von Prostaglandinen beitragen. Andererseits bleibt fraglich, ob die Hemmung der spinalen Prostaglandinbildung der einzige Wirkmechanismus dieser beiden Substanzen ist, da Indometacin die Entwicklung spinaler Hyperexzitabilität nur abschwächte, nicht jedoch vollständig verhinderte. Die durch den entzündlichen Stimulus hervorgerufene starke Induktion der COX-2 und die Produktion von Prostaglandinen durch die neusynthetisierten COX-2-Moleküle könnte die zeitlich limitierte Wirkung des COX-1-Inhibitors SC-560 erklären.

Die spinale Wirkung des COX-1-Inhibitors auf das neuronale Antwortverhalten in der Frühphase der K/C-induzierten Entzündung steht, wie bereits ausgeführt, in Kontrast zu den In-vivo-Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. In vitro birgt die Untersuchung von Spinalganglienzellen kleiner und mittlerer Größe allerdings Hinweise, daß die Einwirkung proinflammatorischer Stimuli in der Tat auch eine Aktivitätszunahme der COX-1 induzieren kann. Diese Neurone werden aufgrund ihres Gehaltes an Substanz P und CGRP als Nozizeptorneurone klassifiziert (Willingale et al., 1997; Chopra et al., 2000). Sie enthalten unter unstimulierten Bedingungen vor allem COX-1. Die durch eine Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration verursachte Depolarisation der Nervenzellmembran ruft innerhalb von 10 min eine starke PGE_2 -Freisetzung hervor, welche durch Ibuprofen, nicht aber selektive COX-2-Hemmer verhindert wurde (Dirig et al., 1997). Die Arachidonsäure-induzierte PGE_2 -Freisetzung in Proteinextrakten aus dem Rückenmark konnte durch Diclofenac vollständig, durch NS-398 jedoch nur zu 30 % gehemmt werden (Goppelt-Struebe & Beiche, 1997). Aufgrund dieser Ergebnisse ist wahrscheinlich, daß auch in vivo nach Einwirkung noxischer Stimuli die COX-1 im Rückenmark zur Synthese von Prostaglandinen beiträgt.

5.3.3. Effekt von L-745,337, SC-560, Indometacin und Diclofenac bei etablierter Hyperexzitabilität

Die Entwicklung der spinalen Übererregbarkeit erreicht 5–6 h nach K/C-Injektion ein Plateau, i.e. die Antworten der Hinterhornneurone auf mechanische Reize steigen danach in der Regel nicht weiter an (Neugebauer et al., 1993). Unter diesen Bedingungen reduzierte L-745,337 dosisabhängig die Reizantworten und führte bei einigen der Neurone zu einer Verkleinerung des rezeptiven Feldes. Wir konnten eine beständige Abnahme der Antwortstärke der Hinterhornneurone beobachten, ohne daß in einem Zeitraum von 200 min eine erkennbare Terminierung der Substanzwirkung auftrat. Im Gegensatz dazu zeigten die nicht-selektiven COX-Inhibitoren Diclofenac und Indometacin sowie der selektive COX-1-Inhibitor SC-560 keinen Effekt auf die Antwortstärke. Da Indometacin (Vasquez et al., 2001) und SC-560 in den verwendeten Konzentrationen die Entstehung entzündungsinduzierter Hyperexzitabilität beeinflussen, kann nicht davon ausgegangen werden, daß die mangelnde Wirksamkeit in diesen Versuchen durch eine zu niedrige Dosierung verursacht wurde. Überraschend war zudem die Beobachtung, daß bei der kombinierten Anwendung von L-745,337 und SC-560 ebenfalls keine Veränderung der neuronalen Antworten eintrat. Dies wäre nach den vorangegangenen Experimenten, die eine zuverlässige Wirksamkeit von L-745,337 zeigten, zu erwarten gewesen.

Wie bereits eingangs erwähnt, adressieren bisher nur wenige Studien die Frage nach der spinalen Wirkung von COX-Inhibitoren bei etablierter Entzündung und die Ergebnisse sind häufig widersprüchlich. Beispielsweise sind ähnliche Auswirkungen der selektiven COX-2-Hemmung von Yamamoto et al. im Verhaltensexperiment nach der intrathekalen Anwendung von NS-398 bei etablierter thermischer Hyperalgesie beschrieben worden. NS-398 führte zwei Stunden nach subkutaner Carrageenan-Injektion dosisabhängig zu einer Verlängerung der Wegziehlatenz bei Ratten (Yamamoto & Nozaki-Taguchi, 1997). Dirig et al. berichteten hingegen, daß Ibuprofen und SC-58125 im gleichen Modell zwar die Entstehung thermaler Hyperalgesie verhinderten, bei i.t.-Applikation drei Stunden nach der Injektion von Carrageenan allerdings keine Wirkung auf die Wegziehlatenz mehr zeigten. Bei systemischer Anwendung waren beide Wirkstoffe unabhängig vom Applikationszeitpunkt wirksam (Dirig et al., 1998).

Für den Wirkungsunterschied zwischen dem selektiven COX-2-Inhibitor auf der einen und den COX-1/COX-2-Inhibitoren Diclofenac, Indometacin sowie dem selektiven COX-1-Inhibitor SC-560 auf der anderen Seite sind verschiedene Erklärungen denkbar.

Die alleinige Wirksamkeit des selektiven COX-2-Hemmers könnte darauf hindeuten, daß ausschließlich Produkte der COX-2 an der Aufrechterhaltung der zentralen Sensibilisierung beteiligt sind. In der Tat beginnt die starke Induktion der COX-2 bereits in den ersten Stunden der Entzündung und ist noch einige Stunden oder Tage nachweisbar. Gegen diese Annahme spricht allerdings, daß Diclofenac als potenter Inhibitor der COX-2 und der COX-1 (O'Neill et al., 1994; Patrignani et al., 1997; Riendeau et al., 1997) die Antworten der Hinterhornneurone nicht reduzierte. Der Einfluß der zeitgleichen Hemmung von COX-1 und COX-2 wurde deshalb in einem weiteren Experiment untersucht, in dem L-745,337 und SC-560 in Kombination spinal appliziert wurden. Diesem Versuch liegt die Überlegung zugrunde, daß somit das Wirkprofil eines nicht-selektiven COX-Hemmers erzeugt wird, die wirksame COX-2-Hemmung durch L-745,337 aber gewährleistet ist. Allerdings konnte auch hier keine Veränderung im Antwortverhalten der Neurone beobachtet werden. Möglicherweise beeinflussen sich COX-1- und COX-2-Hemmung gegenseitig in dem Sinne, daß die durch die Hemmung der COX-2 vermittelten Effekte durch gleichzeitige Hemmung der COX-1 aufgehoben werden. Andererseits ist auf eine Beeinflussung der inhibitorischen Potenz von COX-Hemmern durch verschiedene Detergentien von Ouellet et al. hingewiesen worden (Ouellet et al., 2004). Um auszuschließen, daß eine chemische Interaktion mit dem im Lösungsmittel des COX-1-Inhibitors enthaltenen DMF zu einer Inaktivierung von L-745,337 führte und damit Ursache der mangelnden Wirksamkeit war, wurde L-745,337 in DMF 25%, Glukose 2,5% in aqua dest. gelöst und bei 3 Tieren erneut der Effekt auf das Antwortverhalten untersucht. Es zeigte sich eine starke Reduktion der Antworten. Allerdings ist eine Inaktivierung von L-745,337 durch chemische Wechselwirkung mit SC-560 ebenfalls möglich und als Ursache des Wirkungsverlustes von L-745,337 nicht auszuschließen.

Andererseits sprechen diese Ergebnisse für alternative pathophysiologische Mechanismen. Möglicherweise sind Prostaglandine im beobachteten Zeitraum (6-10 h nach Induktion der Entzündung) nicht maßgeblich an der Aufrechterhaltung der neuronalen Übererregbarkeit beteiligt und der antihyperalgetische Effekt von L-745,337 wird über einen COX-2-unabhängigen Mechanismus vermittelt. Diese Vermutung wurde schon von Vasquez et al. 2001 geäußert, nachdem Indometacin bei etablierter Gelenkentzündung die neuronalen Antworten auf mechanische Reize oder NMDA- bzw. AMPA-Applikation nicht reduzierte. Die gesteigerte Freisetzung von Prostaglandinen und anderen Mediatoren im Rückenmark könnte im Verlauf der peripheren Entzündung zu persistierenden Veränderungen der neuronalen Transmission führen. Da die Aktivierung von PG-Rezeptoren Second-messenger-

Kaskaden initiiert und beispielsweise die intrazelluläre Bildung von cAMP (Vanegas & Schaible, 2001) verstärkt, ist eine Beteiligung von PGE₂ an der Induktion langfristiger Veränderungen der synaptischen Übertragung wahrscheinlich. Eine relative Desensibilisierung spinaler Neurone für Prostaglandine, beispielsweise durch Reduktion der PG-Rezeptordichte oder der Rezeptorempfindlichkeit könnte Folge dieser Effekte sein.

Southall et al. beobachteten in vitro eine signifikante Reduktion der PGE₂-Bindung an sensorischen Neuronen während CFA-induzierter Entzündung bzw. prolongierter PGE₂-Einwirkung auf diese Zellen. Unter diesen Bedingungen war der Anstieg von intrazellulärem cAMP in Neuronen nach PGE₂-Stimulation signifikant reduziert, aber nicht gänzlich aufgehoben (Southall et al., 2002). In vivo konnte eine Verminderung der bahnnenden Wirkung von PGE₂ an spinalen Neuronen bei bestehender Entzündung registriert werden. Der verstärkende Effekt von PGE₂ auf die Antworten nozizeptiver Hinterhornneurone auf mechanische Reizung war in monoarthritischen Ratten signifikant geringer als in Tieren ohne Gelenkentzündung. Im normalen Tier reagierten die Neurone interessanterweise auf die wiederholte Applikation von PGE₂ nicht mit einer Steigerung der Reizantworten (Vasquez et al., 2001).

Aufgrund neuerer funktioneller Untersuchungen wird angenommen, daß die prä- und postsynaptische Expression der PG-Rezeptorsubtypen im Rückenmark während persistierender entzündlicher Prozesse möglicherweise einem dynamischen Wandel unterliegt. Bär et al. stellten im Verlauf einer K/C-induzierten Entzündung ein verändertes Ansprechen von Hinterhornneuronen auf spinal applizierte EP-Rezeptor-Agonisten fest. Bei bestehender Entzündung verstärkte nur ein Agonist am EP1-Rezeptor die durch mechanische Reizung evozierten Antworten. Vor Induktion der Entzündung war dies auch durch EP2- und EP4-Agonisten möglich. Im Gegensatz dazu veränderte ein EP3 α -Agonist das neuronale Antwortverhalten im normalen Tier nicht, führte aber unter Entzündungsbedingungen zu einer signifikanten Reduktion der Antworten (Bär et al., 2004). Während einer persistierenden Entzündung tritt demzufolge einerseits eine Abnahme der über EP2- und EP4-Rezeptoren vermittelten Exzitation spinaler Neurone auf. Andererseits kann PGE₂ bei etablierter Hyperexzitabilität über die Bindung an EP3-Rezeptoren verstärkt inhibitorische Effekte vermitteln. Diese Ergebnisse deuten neben vielen anderen Befunden auf die komplexen Veränderungen der modulatorischen Funktion von Prostaglandinen während der zentralen Sensibilisierung hin.

In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß spinal appliziertes PGE₂ den antihyperalgetischen Effekt von L-745,337 nur bedingt aufheben konnte. Die durch L-745,337 verursachte Abnahme der Antworten auf Reizung des Kniegelenkes war durch gleichzeitige PGE₂-Applikation nicht reversibel. Am nicht entzündeten Sprunggelenk und der Pfote konnten hingegen verstärkte Antworten auf mechanische Reize ausgelöst werden. Die stärkere Wirkung von PGE₂ auf die Reizantworten an Sprunggelenk und Pfote könnte darauf hindeuten, daß in Primärafferenzen aus angrenzenden, nicht direkt von der Entzündung betroffenen Gebieten weniger entzündungsbedingte Veränderungen der Sensibilität für Prostaglandine stattgefunden haben als in Afferenzen aus dem entzündeten Kniegelenk. Die Tatsache, daß die Wirkung von L-745,337 nur teilweise durch PGE₂ antagonisierbar war, unterstützt die Vermutung, daß die PG-Synthesehemmung nicht den alleinigen Wirkmechanismus von L-745,337 darstellen kann. Auch für eine Reihe anderer COX-Hemmstoffe wurde diese Vermutung geäußert.

Aufgrund von klinischen Untersuchungen und In-vivo-Versuchen wurde von verschiedenen Autoren postuliert, daß NSAIDs ihre zentrale analgetische Wirkung neben der PG-Synthesehemmung durch zusätzliche, nicht-COX-assoziierte Mechanismen entfalten. Salicylate beispielsweise können über Bindung an Nervenzellmembranen deren Permeabilität für K⁺- und Cl⁻-Ionen verändern und so zu einer Hyperpolarisation der Zellen führen, (Levitan & Barker, 1972; McLaughlin, 1973). Salicylate und Flurbiprofen beeinflussen außerdem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB, der wiederum die Expression proinflammatorischer Enzyme, Zytokine und Adhäsionsmoleküle reguliert (Tegeder et al., 2001). Andere Autoren weisen auf eine mögliche direkte Verkettung von COX-Prostaglandin-System und endogenen Cannabinoiden hin. Der antinozizeptive Effekt von COX-Inhibitoren soll neben der PG-Synthesehemmung auf anderen Mechanismen beruhen, die zu einem Anstieg von Cannabinoiden führen (Gühring et al., 2002; Ates et al., 2003). So inhibiert Indometacin neben cAMP-abhängigen Proteinkinasen (Kantor & Hampton, 1978) die Fettsäure-Amid-Hydrolase (FAAH; Fowler et al., 2000). Das Enzym FAAH hydrolysiert endogene Fettsäure-Amide wie Anandamid und Palmitoylethanolamid, die über eine Bindung an Cannabinoid-Rezeptoren im Zentralnervensystem die nozizeptive Transmission beeinflussen können. Weiterhin ist die COX-2 am Abbau von Cannabinoiden beteiligt (Kim & Alger, 2004; Kozak et al., 2004). Eine Blockade dieses Enzymes würde folglich zu erhöhten Konzentrationen von Anandamid an entsprechenden Rezeptoren führen. In wieweit PG- bzw. COX-unabhängige Angriffsorte zur Wirkung von L-745,337 oder auch SC-560 im speziellen beitragen ist bislang ungeklärt und stellt in Zukunft einen interessanten Forschungsansatz dar.

5.4. Systemische Wirkung von L-745,337 und SC-560 bei etablierter Hyperexzitabilität

Die von uns beobachtete Wirksamkeit von L-745,337 und SC-560 bei systemischer Applikation ist konsistent mit den Beobachtungen zahlreicher Arbeitsgruppen, die sowohl in Verhaltensexperimenten als auch mit elektrophysiologischen Untersuchungen belegen, daß selektive COX-2- und COX-1-Hemmer ähnlich effektiv wie nicht-selektive NSAIDs ein Fortschreiten der Entzündung verhindern und die entstandenen Sensibilisierungsvorgänge im nozizeptiven System abschwächen können. Als Wirkmechanismus der NSAIDs ist die Hemmung der Prostaglandinproduktion im Entzündungsgebiet und damit der Wegfall eines wichtigen proinflammatorischen Mediators hervorgehoben worden (Masferrer et al., 1994; Zhang et al., 1997).

Für L-745,337 im speziellen wurde von Chan et al. gezeigt, daß die systemische Gabe dieses COX-2-Hemmers die Carrageenan-induzierte Schwellung und Hyperalgesie der Pfote verhinderte bzw. rückgängig machte, Endotoxin-induziertes Fieber senkte sowie die PGE₂-Konzentrationen im Pleuraexsudat nach Carrageenan-Infiltration verminderte (Chan et al., 1995). Die systemische Applikation von SC-560 verhinderte die Entstehung Carrageenan-induzierter thermaler Hyperalgesie sowie die PGE₂-Freisetzung in die Pfote, hatte aber keinen Einfluß auf die Substanz P- und Carrageenan-induzierte PGE₂-Freisetzung im Rückenmark (Smith, CJ et al., 1998; Yaksh et al., 2001). Mazario et al. beobachteten unter der Anwendung des selektiven COX-1-Inhibitors SC-58560 eine Abnahme der entzündlichen Schwellung sowie eine Reduktion mechanischer Hyperalgesie bei etablierter Weichteilentzündung durch Carrageenan. In dieser Studie zeigte hingegen der selektive COX-2-Inhibitor Rofecoxib diese antiinflammatorische Wirkung nicht (Mazario et al., 2001). Chan et al. demonstrierten auf der anderen Seite Rofecoxib als potenten Wirkstoff in Modellen wie der Carrageenan-induzierten Hyperalgesie und Ödembildung, der Endotoxin-induzierten Fieberreaktion sowie der Adjuvant-induzierten Arthritis (Chan et al., 1999).

Da SC-560 bei spinaler Gabe keinen Einfluß auf die Antworten hyperexzitabler Neurone zeigte, muß angenommen werden, daß die Wirkung von systemisch appliziertem SC-560 vor allem auf extraspinale Angriffsorte zurückzuführen ist, i.e. die Hemmung der Prostaglandine im Entzündungsgebiet. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, daß in unseren Experimenten die intraperitoneale Injektion von L-745,337 nach vorheriger spinaler Applikation die Geschwindigkeit der Antwortreduktion nicht wesentlich beeinflusste und somit der spinale Anteil der COX-2-Hemmung bedeutend zur Wirkung beizutragen scheint.

5.5. Schlussfolgerungen

Zusammenfassend kann aufgrund dieser Ergebnisse angenommen werden, daß spinale Prostaglandine bei der Entstehung der zentralen Sensibilisierung eine wesentliche Rolle spielen. In der Frühphase der Entzündung katalysieren vermutlich konstitutiv im Rückenmark vorhandene COX-1- und COX-2-Moleküle die Prostaglandinbildung, während später durch die entzündungsbedingt stark vermehrte Expression hauptsächlich die COX-2 zu deren Synthese beiträgt. Im Verlauf der Entzündung werden möglicherweise komplexe persistierende Veränderungen auf spinaler Ebene initiiert, die einer Modulation durch Prostaglandine nicht mehr im gleichen Ausmaß zugänglich sind. Für die antihyperalgetische Wirkung des selektiven COX-2-Inhibitors L-745,337 bei etablierter spinaler Übererregbarkeit müssen deshalb neben der Hemmung der COX-2 bzw. der Prostaglandin-Synthese alternative, nicht-COX-assoziierte Wirkmechanismen in Betracht gezogen werden. In diesem Zusammenhang könnte beispielsweise die Bestimmung der Prostaglandinspiegel im Rückenmark unter Einwirkung der verschiedenen COX-Inhibitoren einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der Wirkmechanismen dieser Substanzen leisten.

Die COX-Isoenzyme tragen zudem peripher und zentral unterschiedlich zur Synthese von Prostaglandinen während entzündlicher Vorgänge bei. Während die COX-1-Hemmung im Rückenmark unmittelbar nach Einwirkung des entzündlichen Stimulus die Sensibilisierung von Hinterhornneuronen verhindern konnte, im Entzündungsverlauf jedoch nur bei systemischer Anwendung antinozizeptive Effekte erzeugte, erwies sich L-745,337 bei systemischer und spinaler Gabe effektiv. Die ähnlich starke therapeutische Wirksamkeit nicht-selektiver COX-Inhibitoren beruht folglich wahrscheinlich auf der PG-Synthesehemmung im Entzündungsgebiet. Für die ausgeprägte zentrale antihyperalgetische Wirkung von L-745,337 bei etablierter spinaler Übererregbarkeit müssen neben der Hemmung der COX-2 alternative, COX- bzw. Prostaglandin-unabhängige Wirkmechanismen im Zentralnervensystem in Betracht gezogen werden. Insbesondere die weitere Erforschung der zentralen Angriffsorte bzw. Wirkmechanismen von COX-2-Inhibitoren und die Beleuchtung der Veränderungen in chronischen Entzündungsmodellen stellen eine interessante Herausforderung dar.

LITERATURVERZEICHNIS

- Anderson GD, Hauser SD, McGarity KL, Bremer ME, Isakson PC, Gregory SA (1996) Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest* 97(11): 2672-9.
- Appleton I, Tomlinson A, Mitchell JA, Willoughby DA (1995) Distribution of cyclooxygenase isoforms in murine chronic granulomatous inflammation. Implications for future anti-inflammatory therapy. *J Pathol* 176(4): 413-20.
- Ascher P, Nowak L (1988) The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J Physiol* 399: 247-66.
- Ates M, Hamza M, Seidel K, Kotalla CE, Ledent C, Guhring H (2003) Intrathecally applied flurbiprofen produces an endocannabinoid-dependent antinociception in the rat formalin test. *Eur J Neurosci* 17(3): 597-604.
- Baba H, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ (2001) Direct activation of rat spinal dorsal horn neurons by prostaglandin E2. *J Neurosci* 21(5): 1750-6.
- Bär KJ, Natura G, Telleria-Diaz A, Teschner P, Vogel R, Vasquez E, Schaible HG, Ebersberger A (2004) Changes in the effect of spinal prostaglandin E2 during inflammation: prostaglandin E (EP1-EP4) receptors in spinal nociceptive processing of input from the normal or inflamed knee joint. *J Neurosci* 24(3): 642-51.
- Basbaum AI, Wall PD (1976) Chronic changes in the response of cells in adult cat dorsal horn following partial deafferentation: the appearance of responding cells in a previously non-responsive region. *Brain Res* 116(2): 181-204.
- Bauer MK, Lieb K, Schulze-Osthoff K, Berger M, Gebicke-Haerter PJ, Bauer J, Fiebich BL (1997) Expression and regulation of cyclooxygenase-2 in rat microglia. *Eur J Biochem* 243(3): 726-31.
- Beiche F, Scheuerer S, Brune K, Geisslinger G, Goppelt-Struebe M (1996) Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Lett* 390(2): 165-9.
- Beiche F, Brune K, Geisslinger G, Goppelt-Struebe M (1998a) Expression of cyclooxygenase isoforms in the rat spinal cord and their regulation during adjuvant-induced arthritis. *Inflamm Res* 47(12): 482-7.
- Beiche F, Klein T, Nusing R, Neuhuber W, Goppelt-Struebe M (1998b) Localization of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 receptor EP3 in the rat lumbar spinal cord. *J Neuroimmunol* 89(1-2): 26-34.
- Bensen WG, Fiechtner JJ, McMillen JI, Zhao WW, Yu SS, Woods EM, Hubbard RC, Isakson PC, Verburg KM, Geis GS (1999) Treatment of osteoarthritis with celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor: a randomized controlled trial. *Mayo Clin Proc* 74(11): 1095-105.
- Birrell GJ, McQueen DS, Iggo A, Coleman RA, Grubb BD (1991) PGI2-induced activation and sensitization of articular mechanonociceptors. *Neurosci Lett* 124(1): 5-8.
- Birrell GJ, McQueen DS, Iggo A, Grubb BD (1993) Prostanoid-induced potentiation of the excitatory and sensitizing effects of bradykinin on articular mechanonociceptors in the rat ankle joint. *Neuroscience* 54(2): 537-44.
- Brune K, Glatt M (1974) The avian microcrystal arthritis. 3. Invasion and enzyme-release from leukocytes at the site of inflammation. *Agents Actions* 4(2): 95-100.

- Burian M, Geisslinger G (2003) Klinische Pharmakologie der selektiven COX-2-Hemmer. *Der Orthopäde* 32(12): 1078-87.
- Campbell JN, Meyer RA (1983) Sensitization of unmyelinated nociceptive afferents in monkey varies with skin type. *J Neurophysiol* 49(1): 98-110.
- Chan CC, Boyce S, Brideau C, Ford-Hutchinson AW, Gordon R, Guay D, Hill RG, Li CS, Mancini J, Penne-ton M, et al. (1995) Pharmacology of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, L-745,337: a novel nonsteroidal anti-inflammatory agent with an ulcerogenic sparing effect in rat and nonhuman primate stomach. *J Pharmacol Exp Ther* 274(3): 1531-7.
- Chan CC, Boyce S, Brideau C, Charleson S, Cromlish W, Ethier D, Evans J, Ford-Hutchinson AW, Forrest MJ, Gauthier JY, Gordon R, Gresser M, Guay J, Kargman S, Kennedy B, Leblanc Y, Leger S, Mancini J, O'Neill GP, Ouellet M, Patrick D, Percival MD, Perrier H, Prasit P, Rodger I, et al. (1999) Rofecoxib [Vioxx, MK-0966; 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furanone]: a potent and orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. Pharmacological and biochemical profiles. *J Pharmacol Exp Ther* 290(2): 551-60.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(21): 13926-31.
- Chopra B, Giblett S, Little JG, Donaldson LF, Tate S, Evans RJ, Grubb BD (2000) Cyclooxygenase-1 is a marker for a subpopulation of putative nociceptive neurons in rat dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci* 12(3): 911-20.
- Clarke RW, Matthews B (1990) The thresholds of the jaw-opening reflex and trigeminal brainstem neurons to tooth-pulp stimulation in acutely and chronically prepared cats. *Neuroscience* 36(1): 105-14.
- Coderre TJ, Gonzales R, Goldyne ME, West J, Levine JD (1990) Noxious stimulus-induced increase in spinal prostaglandin E2 is noradrenergic terminal-dependent. *Neurosci Lett* 115(2-3): 253-8.
- Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R (1993) Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* 52(3): 259-85.
- Crofford LJ, Wilder RL, Ristimäki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR, Hla T (1994) Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest* 93(3): 1095-101.
- Crofford LJ (1997) COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol* 24 Suppl 49: 15-9.
- Cromlish WA, Kennedy BP (1996) Selective inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 using intact insect cell assays. *Biochem Pharmacol* 52(11): 1777-85.
- Daudet A: *Im Land der Schmerzen*. Manholt Verlag, Bremen (2003)
- Dirig DM, Konin GP, Isakson PC, Yaksh TL (1997) Effect of spinal cyclooxygenase inhibitors in rat using the formalin test and in vitro prostaglandin E2 release. *Eur J Pharmacol* 331(2-3): 155-60.
- Dirig DM, Isakson PC, Yaksh TL (1998) Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 285(3): 1031-8.
- Donaldson LF, Humphrey PS, Oldfield S, Giblett S, Grubb BD (2001) Expression and regulation of prostaglandin E receptor subtype mRNAs in rat sensory ganglia and spinal cord in response to peripheral inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 63(3): 109-22.

- Dougherty PM, Sluka KA, Sorkin LS, Westlund KN, Willis WD (1992) Neural changes in acute arthritis in monkeys. I. Parallel enhancement of responses of spinothalamic tract neurons to mechanical stimulation and excitatory amino acids. *Brain Res Brain Res Rev* 17(1): 1-13.
- Dougherty PM, Willis WD (1992) Enhanced responses of spinothalamic tract neurons to excitatory amino acids accompany capsaicin-induced sensitization in the monkey. *J Neurosci* 12(3): 883-94.
- Ebersberger A, Grubb BD, Gardiner NJ, Schaible HG (1997) Intraspinal release of immunoreactive prostaglandins without and during development of acute inflammation in the rat knee joint. *Soc. Neurosci. (Abstr.)* 23: 1808.
- Ebersberger A, Grubb BD, Willingale HL, Gardiner NJ, Nebe J, Schaible HG (1999) The intraspinal release of prostaglandin E2 in a model of acute arthritis is accompanied by an up-regulation of cyclo-oxygenase-2 in the spinal cord. *Neuroscience* 93(2): 775-81.
- Ferreira SH (1972) Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol* 240(102): 200-3.
- Ferreira SH, Moncada S, Vane JR (1973) Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. *Br J Pharmacol* 49(1): 86-97.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB (1996) Intrathecal administration of prostaglandin E2 causes sensitization of the primary afferent neuron via the spinal release of glutamate. *Inflamm Res* 45(10): 499-502.
- Foley KM, Inturrisi CE (1987) Analgesic drug therapy in cancer pain: principles and practice. *Med Clin North Am* 71(2): 207-32.
- Fowler CJ, Borjesson M, Tiger G (2000) Differences in the pharmacological properties of rat and chicken brain fatty acid amidohydrolase. *Br J Pharmacol* 131(3): 498-504.
- Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294(5548): 1871-5.
- Geisslinger G, Muth-Selbach U, Coste O, Vetter G, Schrodter A, Schaible HG, Brune K, Tegeder I (2000) Inhibition of noxious stimulus-induced spinal prostaglandin E2 release by flurbiprofen enantiomers: a microdialysis study. *J Neurochem* 74(5): 2094-100.
- Ghilardi JR, Svensson CI, Rogers SD, Yaksh TL, Mantyh PW (2004) Constitutive spinal cyclooxygenase-2 participates in the initiation of tissue injury-induced hyperalgesia. *J Neurosci* 24(11): 2727-32.
- Gierse JK, Hauser SD, Creely DP, Koboldt C, Rangwala SH, Isakson PC, Seibert K (1995) Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclo-oxygenase. *Biochem J* 305 (Pt 2): 479-84.
- Gold MS, Reichling DB, Shuster MJ, Levine JD (1996) Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(3): 1108-12.
- Gold MS, Levine JD, Correa AM (1998) Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *J Neurosci* 18(24): 10345-55.
- Goppelt-Strube M, Beiche F (1997) Cyclooxygenase-2 in the spinal cord: localization and regulation after a peripheral inflammatory stimulus. *Adv Exp Med Biol* 433: 213-6.
- Grubb BD, Stiller RU, Schaible HG (1993) Dynamic changes in the receptive field properties of spinal cord neurons with ankle input in rats with chronic unilateral inflammation in the ankle region. *Exp Brain Res* 92(3): 441-52.
- Gühring H, Gorig M, Ates M, Coste O, Zeilhofer HU, Pahl A, Rehse K, Brune K (2000) Suppressed injury-induced rise in spinal prostaglandin E2 production and reduced early thermal hyperalgesia in iNOS-deficient mice. *J Neurosci* 20(17): 6714-20.

- Gühring H, Hamza M, Sergejeva M, Ates M, Kotalla CE, Ledent C, Brune K (2002) A role for endocannabinoids in indomethacin-induced spinal antinociception. *Eur J Pharmacol* 454(2-3): 153-63.
- Halata Z, Badalamente MA, Dee R, Propper M (1984) Ultrastructure of sensory nerve endings in monkey (*Macaca fascicularis*) knee joint capsule. *J Orthop Res* 2(2): 169-76.
- Handwerker HO (1976) Influences of algogenic substance and prostaglandins on the discharges of unmyelinated cutaneous nerve fibres identified as nociceptors. *Adv Pain Res Ther* 1: 41-5.
- Handwerker HO: Einführung in die Pathophysiologie des Schmerzes. Springer-Verlag, Berlin (1998)
- Hardy JD, Wolff HG, Goodell H (1950) Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. *J Clin Invest* 29: 115-40.
- Hartell NA, Headley PM (1990) Spinal effects of four injectable anaesthetics on nociceptive reflexes in rats: a comparison of electrophysiological and behavioural measurements. *Br J Pharmacol* 101(3): 563-8.
- Hartell NA, Headley PM (1991) Preparative surgery enhances the direct spinal actions of three injectable anaesthetics in the anaesthetized rat. *Pain* 46(1): 75-80.
- Hay CH, de Belleruche JS (1997) Carrageenan-induced hyperalgesia is associated with increased cyclooxygenase-2 expression in spinal cord. *Neuroreport* 8(5): 1249-51.
- Hay CH, Trevethick MA, Wheeldon A, Bowers JS, de Belleruche JS (1997) The potential role of spinal cord cyclooxygenase-2 in the development of Freund's complete adjuvant-induced changes in hyperalgesia and allodynia. *Neuroscience* 78(3): 843-50.
- Hay CH, de Belleruche JS (1998) Dexamethasone prevents the induction of COX-2 mRNA and prostaglandins in the lumbar spinal cord following intraplantar FCA in parallel with inhibition of oedema. *Neuropharmacology* 37(6): 739-44.
- Heppelmann B, Messlinger K, Neiss WF, Schmidt RF (1990) Ultrastructural three-dimensional reconstruction of group III and group IV sensory nerve endings ("free nerve endings") in the knee joint capsule of the cat: evidence for multiple receptive sites. *J Comp Neurol* 292(1): 103-16.
- Hildebrand C, Oqvist G, Brax L, Tuisku F (1991) Anatomy of the rat knee joint and fibre composition of a major articular nerve. *Anat Rec* 229(4): 545-55.
- Hingtgen CM, Waite KJ, Vasko MR (1995) Prostaglandins facilitate peptide release from rat sensory neurons by activating the adenosine 3',5'-cyclic monophosphate transduction cascade. *J Neurosci* 15(7 Pt 2): 5411-9.
- Hirst WD, Young KA, Newton R, Allport VC, Marriott DR, Wilkin GP (1999) Expression of COX-2 by normal and reactive astrocytes in the adult rat central nervous system. *Mol Cell Neurosci* 13(1): 57-68.
- Hoff T, DeWitt D, Kaever V, Resch K, Goppelt-Strube M (1993) Differentiation-associated expression of prostaglandin G/H synthase in monocytic cells. *FEBS Lett* 320(1): 38-42.
- Hua XY, Jinno S, Back SM, Tam EK, Yaksh TL (1994) Multiple mechanisms for the effects of capsaicin, bradykinin and nicotine on CGRP release from tracheal afferent nerves: role of prostaglandins, sympathetic nerves and mast cells. *Neuropharmacology* 33(10): 1147-54.
- Hua XY, Chen P, Marsala M, Yaksh TL (1999) Intrathecal substance P-induced thermal hyperalgesia and spinal release of prostaglandin E2 and amino acids. *Neuroscience* 89(2): 525-34.
- IASP (1979) Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain* 6(3): 248-52.

- Ibuki T, Matsumura K, Yamazaki Y, Nozaki T, Tanaka Y, Kobayashi S (2003) Cyclooxygenase-2 is induced in the endothelial cells throughout the central nervous system during carrageenan-induced hind paw inflammation; its possible role in hyperalgesia. *J Neurochem* 86(2): 318-28.
- Inoue A, Ikoma K, Morioka N, Kumagai K, Hashimoto T, Hide I, Nakata Y (1999) Interleukin-1 β induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase-2 system. *J Neurochem* 73(5): 2206-13.
- Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (1993) Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem* 268(12): 9049-54.
- Kantor HS, Hampton M (1978) Indomethacin in submicromolar concentrations inhibits cyclic AMP-dependent protein kinase. *Nature* 276(5690): 841-2.
- Katori M, Majima M, Harada Y (1998) Possible background mechanisms of the effectiveness of cyclooxygenase-2 inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis. *Inflamm Res* 47 Suppl 2: S107-11.
- Kawamura T, Yamauchi T, Koyama M, Maruyama T, Akira T, Nakamura N (1997) Expression of prostaglandin EP2 receptor mRNA in the rat spinal cord. *Life Sci* 61(21): 2111-6.
- Kim J, Alger BE (2004) Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. *Nat Neurosci* 7(7): 697-8.
- Klineberg I (1971) Structure and function of temporomandibular joint innervation. *Ann R Coll Surg Engl* 49(4): 268-88.
- Koetzner L, Hua XY, Lai J, Porreca F, Yaksh T (2004) Nonopioid actions of intrathecal dynorphin evoke spinal excitatory amino acid and prostaglandin E₂ release mediated by cyclooxygenase-1 and -2. *J Neurosci* 24(6): 1451-8.
- Kozak KR, Prusakiewicz JJ, Marnett LJ (2004) Oxidative metabolism of endocannabinoids by COX-2. *Curr Pharm Des* 10(6): 659-67.
- Kress M, Koltzenburg M, Reeh PW, Handwerker HO (1992) Responsiveness and functional attributes of electrically localized terminals of cutaneous C-fibers in vivo and in vitro. *J Neurophysiol* 68(2): 581-95.
- LaMotte RH, Lundberg LE, Torebjork HE (1992) Pain, hyperalgesia and activity in nociceptive C units in humans after intradermal injection of capsaicin. *J Physiol* 448: 749-64.
- Langford LA, Schmidt RF (1983) Afferent and efferent axons in the medial and posterior articular nerves of the cat. *Anat Rec* 206(1): 71-8.
- Lawson SN, Perry MJ, Prabhakar E, McCarthy PW (1993) Primary sensory neurones: neurofilament, neuropeptides, and conduction velocity. *Brain Res Bull* 30(3-4): 239-43.
- Levitan H, Barker JL (1972) Effect of non-narcotic analgesics on membrane permeability of molluscan neurones. *Nat New Biol* 239(89): 55-7.
- Li P, Wilding TJ, Kim SJ, Calejesan AA, Huettner JE, Zhuo M (1999) Kainate-receptor-mediated sensory synaptic transmission in mammalian spinal cord. *Nature* 397(6715): 161-4.
- Lima D (1997) Functional anatomy of spinofugal nociceptive pathways. *Pain Rev* 4: 1-19.
- Liu XG, Sandkühler J (1995) Long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal N-methyl-D-aspartic acid receptor blockage. *Neurosci Lett* 191(1-2): 43-6.

- Liu XG, Sandkühler J (1997) Characterization of long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in spinal dorsal horn of adult rat: essential role of NK1 and NK2 receptors. *J Neurophysiol* 78(4): 1973-82.
- Maihofner C, Tegeder I, Euchenhofner C, deWitt D, Brune K, Bang R, Neuhuber W, Geisslinger G (2000) Localization and regulation of cyclo-oxygenase-1 and -2 and neuronal nitric oxide synthase in mouse spinal cord. *Neuroscience* 101(4): 1093-108.
- Malmberg AB, Yaksh TL (1992a) Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 263(1): 136-46.
- Malmberg AB, Yaksh TL (1992b) Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science* 257(5074): 1276-9.
- Malmberg AB, Yaksh TL (1995a) Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *J Neurosci* 15(4): 2768-76.
- Malmberg AB, Yaksh TL (1995b) The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E2 using microdialysis in conscious rats. *Br J Pharmacol* 114(5): 1069-75.
- Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K (1994) Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8): 3228-32.
- Maslany S, Crockett DP, Egger MD (1992) Organization of cutaneous primary afferent fibers projecting to the dorsal horn in the rat: WGA-HRP versus B-HRP. *Brain Res* 569(1): 123-35.
- Mazario J, Gaitan G, Herrero JF (2001) Cyclooxygenase-1 vs. cyclooxygenase-2 inhibitors in the induction of antinociception in rodent withdrawal reflexes. *Neuropharmacology* 40(7): 937-46.
- McCleskey EW, Gold MS (1999) Ion channels of nociception. *Annu Rev Physiol* 61: 835-56.
- McCormack K, Brune K (1991) Dissociation between the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A survey of their analgesic efficacy. *Drugs* 41(4): 533-47.
- McLaughlin S (1973) Salicylates and phospholipid bilayer membranes. *Nature* 243(5404): 234-6.
- Mense S (1981) Sensitization of group IV muscle receptors to bradykinin by 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E2. *Brain Res* 225(1): 95-105.
- Messlinger K (1996) Functional morphology of nociceptive and other fine sensory endings (free nerve endings) in different tissues. *Prog Brain Res* 113: 273-98.
- Minami T, Uda R, Horiguchi S, Ito S, Hyodo M, Hayaishi O (1992) Allodynia evoked by intrathecal administration of prostaglandin F2 alpha to conscious mice. *Pain* 50(2): 223-9.
- Minami T, Nishihara I, Uda R, Ito S, Hyodo M, Hayaishi O (1994a) Characterization of EP-receptor subtypes involved in allodynia and hyperalgesia induced by intrathecal administration of prostaglandin E2 to mice. *Br J Pharmacol* 112(3): 735-40.
- Minami T, Uda R, Horiguchi S, Ito S, Hyodo M, Hayaishi O (1994b) Allodynia evoked by intrathecal administration of prostaglandin E2 to conscious mice. *Pain* 57(2): 217-23.
- Minami T, Okuda-Ashitaka E, Mori H, Ito S, Hayaishi O (1996) Prostaglandin D2 inhibits prostaglandin E2-induced allodynia in conscious mice. *J Pharmacol Exp Ther* 278(3): 1146-52.

- Mizumura K, Sato J, Kumazawa T (1991) Comparison of the effects of prostaglandins E2 and I2 on testicular nociceptor activities studied in vitro. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 344(3): 368-76.
- Moore AR, Willis D, Gilroy D, Tomlinson A, Appleton I, Willoughby DA (1995) Cyclooxygenase in rat pleural hypersensitivity reactions. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 23: 349-51.
- Murakami M, Matsumoto R, Austen KF, Arm JP (1994) Prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 couple to different transmembrane stimuli to generate prostaglandin D2 in mouse bone marrow-derived mast cells. *J Biol Chem* 269(35): 22269-75.
- Muth-Selbach US, Tegeder I, Brune K, Geisslinger G (1999) Acetaminophen inhibits spinal prostaglandin E2 release after peripheral noxious stimulation. *Anesthesiology* 91(1): 231-9.
- Nantel F, Denis D, Gordon R, Northey A, Cirino M, Metters KM, Chan CC (1999) Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br J Pharmacol* 128(4): 853-9.
- Needleman P, Isakson PC (1997) The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol* 24 Suppl 49: 6-8.
- Neugebauer V, Schaible HG (1988) Peripheral and spinal components of the sensitization of spinal neurons during an acute experimental arthritis. *Agents Actions* 25(3-4): 234-6.
- Neugebauer V, Schaible HG (1990) Evidence for a central component in the sensitization of spinal neurons with joint input during development of acute arthritis in cat's knee. *J Neurophysiol* 64(1): 299-311.
- Neugebauer V, Lucke T, Schaible HG (1993) N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists block the hyperexcitability of dorsal horn neurons during development of acute arthritis in rat's knee joint. *J Neurophysiol* 70(4): 1365-77.
- Neugebauer V, Rumenapp P, Schaible HG (1996) Calcitonin gene-related peptide is involved in the spinal processing of mechanosensory input from the rat's knee joint and in the generation and maintenance of hyperexcitability of dorsal horn-neurons during development of acute inflammation. *Neuroscience* 71(4): 1095-109.
- Nicol GD, Klingberg DK, Vasko MR (1992) Prostaglandin E2 increases calcium conductance and stimulates release of substance P in avian sensory neurons. *J Neurosci* 12(5): 1917-27.
- Nicol GD, Vasko MR, Evans AR (1997) Prostaglandins suppress an outward potassium current in embryonic rat sensory neurons. *J Neurophysiol* 77(1): 167-76.
- Nishihara I, Minami T, Uda R, Ito S, Hyodo M, Hayaishi O (1995) Effect of NMDA receptor antagonists on prostaglandin E2-induced hyperalgesia in conscious mice. *Brain Res* 677(1): 138-44.
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307(5950): 462-5.
- Oida H, Namba T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ohishi H, Ichikawa A, Narumiya S (1995) In situ hybridization studies of prostacyclin receptor mRNA expression in various mouse organs. *Br J Pharmacol* 116(7): 2828-37.
- O'Neill GP, Mancini JA, Kargman S, Yergey J, Kwan MY, Falgout JP, Abramovitz M, Kennedy BP, Ouellet M, Cromlish W, et al. (1994) Overexpression of human prostaglandin G/H synthase-1 and -2 by recombinant vaccinia virus: inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and biosynthesis of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Mol Pharmacol* 45(2): 245-54.
- Otto JC, Smith WL (1994) The orientation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 269(31): 19868-75.
- Otto JC, Smith WL (1995) Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12(2-3): 139-56.

- Ouellet M, Falgout JP, Percival MD (2004) Detergents profoundly affect inhibitor potencies against both cyclo-oxygenase isoforms. *Biochem J* 377(Pt 3): 675-84.
- Pairet M, van Ryn J (1998) Experimental models used to investigate the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res* 47 Suppl 2: S93-101.
- Park YH, Shin CY, Lee TS, Huh IH, Sohn UD (2000) The role of nitric oxide and prostaglandin E2 on the hyperalgesia induced by excitatory amino acids in rats. *J Pharm Pharmacol* 52(4): 431-6.
- Patrignani P, Panara MR, Sciulli MG, Santini G, Renda G, Patrono C (1997) Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Physiol Pharmacol* 48(4): 623-31.
- Perl ER, Kumazawa T, Lynn B, Kenins P (1976) Sensitization of high threshold receptors with unmyelinated (C) afferent fibers. *Prog Brain Res* 43: 263-77.
- Perl ER: Pain and nociception. (Hrsg.): *Handbook of Physiology. The Nervous System. Sensory Processes*. Am. Physiol. Soc., Bethesda, MD, (1984): S. 915-75.
- Powell KJ, Hosokawa A, Bell A, Sutak M, Milne B, Quirion R, Jhamandas K (1999) Comparative effects of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase inhibition on the development and reversal of spinal opioid tolerance. *Br J Pharmacol* 127(3): 631-44.
- Proske U, Schaible HG, Schmidt RF (1988) Joint receptors and kinaesthesia. *Exp Brain Res* 72(2): 219-24.
- Ramwell PW, Shaw JE (1966) Spontaneous and evoked release of prostaglandins from cerebral cortex of anesthetized cats. *Am J Physiol* 211(1): 125-34.
- Reeve AJ, Patel S, Fox A, Walker K, Urban L (2000) Intrathecally administered endotoxin or cytokines produce allodynia, hyperalgesia and changes in spinal cord neuronal responses to nociceptive stimuli in the rat. *Eur J Pain* 4(3): 247-57.
- Resnick DK, Graham SH, Dixon CE, Marion DW (1998) Role of cyclooxygenase 2 in acute spinal cord injury. *J Neurotrauma* 15(12): 1005-13.
- Riendeau D, Charleson S, Cromlish W, Mancini JA, Wong E, Guay J (1997) Comparison of the cyclooxygenase-1 inhibitory properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and selective COX-2 inhibitors, using sensitive microsomal and platelet assays. *Can J Physiol Pharmacol* 75(9): 1088-95.
- Sakai M, Minami T, Hara N, Nishihara I, Kitade H, Kamiyama Y, Okuda K, Takahashi H, Mori H, Ito S (1998) Stimulation of nitric oxide release from rat spinal cord by prostaglandin E2. *Br J Pharmacol* 123(5): 890-4.
- Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ (2001) Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* 410(6827): 471-5.
- Sano H, Hla T, Maier JA, Crofford LJ, Case JP, Maciag T, Wilder RL (1992) In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. *J Clin Invest* 89(1): 97-108.
- Schaible HG, Schmidt RF (1983a) Responses of fine medial articular nerve afferents to passive movements of knee joints. *J Neurophysiol* 49(5): 1118-26.
- Schaible HG, Schmidt RF (1983b) Activation of groups III and IV sensory units in medial articular nerve by local mechanical stimulation of knee joint. *J Neurophysiol* 49(1): 35-44.

- Schaible HG, Schmidt RF, Willis WD (1987a) Convergent inputs from articular, cutaneous and muscle receptors onto ascending tract cells in the cat spinal cord. *Exp Brain Res* 66(3): 479-88.
- Schaible HG, Schmidt RF, Willis WD (1987b) Enhancement of the responses of ascending tract cells in the cat spinal cord by acute inflammation of the knee joint. *Exp Brain Res* 66(3): 489-99.
- Schaible HG, Schmidt RF (1988a) Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. *J Neurophysiol* 60(6): 2180-95.
- Schaible HG, Schmidt RF (1988b) Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E2. *J Physiol* 403: 91-104.
- Schaible HG, Neugebauer V, Cervero F, Schmidt RF (1991) Changes in tonic descending inhibition of spinal neurons with articular input during the development of acute arthritis in the cat. *J Neurophysiol* 66(3): 1021-32.
- Schaible HG, Grubb BD (1993) Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain* 55(1): 5-54.
- Schepelmann K, Messlinger K, Schaible HG, Schmidt RF (1992) Inflammatory mediators and nociception in the joint: excitation and sensitization of slowly conducting afferent fibers of cat's knee by prostaglandin I2. *Neuroscience* 50(1): 237-47.
- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P (1994) Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(25): 12013-7.
- Seybold VS, Jia YP, Abrahams LG (2003) Cyclo-oxygenase-2 contributes to central sensitization in rats with peripheral inflammation. *Pain* 105(1-2): 47-55.
- Sluka KA, Westlund KN (1993) Behavioral and immunohistochemical changes in an experimental arthritis model in rats. *Pain* 55(3): 367-77.
- Smith CJ, Morrow JD, Roberts LJ, 2nd, Marnett LJ (1993) Differentiation of monocytoid THP-1 cells with phorbol ester induces expression of prostaglandin endoperoxide synthase-1 (COX-1). *Biochem Biophys Res Commun* 192(2): 787-93.
- Smith CJ, Zhang Y, Koboldt CM, Muhammad J, Zweifel BS, Shaffer A, Talley JJ, Masferrer JL, Seibert K, Isakson PC (1998) Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(22): 13313-8.
- Smith JB, Willis AL (1971) Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nat New Biol* 231(25): 235-7.
- Southall MD, Bolyard LA, Vasko MR (2002) Twenty-four hour exposure to prostaglandin downregulates prostanoid receptor binding but does not alter PGE(2)-mediated sensitization of rat sensory neurons. *Pain* 96(3): 285-96.
- Stucky CL, Thayer SA, Seybold VS (1996) Prostaglandin E2 increases the proportion of neonatal rat dorsal root ganglion neurons that respond to bradykinin. *Neuroscience* 74(4): 1111-23.
- Sugimoto Y, Shigemoto R, Namba T, Negishi M, Mizuno N, Narumiya S, Ichikawa A (1994) Distribution of the messenger RNA for the prostaglandin E receptor subtype EP3 in the mouse nervous system. *Neuroscience* 62(3): 919-28.
- Svensson CI, Yaksh TL (2002) The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 553-83.
- Swett JE, Woolf CJ (1985) The somatotopic organization of primary afferent terminals in the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 231(1): 66-77.

- Szekely JI, Torok K, Mate G (2002) The role of ionotropic glutamate receptors in nociception with special regard to the AMPA binding sites. *Curr Pharm Des* 8(10): 887-912.
- Taiwo YO, Levine JD (1988) Prostaglandins inhibit endogenous pain control mechanisms by blocking transmission at spinal noradrenergic synapses. *J Neurosci* 8(4): 1346-9.
- Taiwo YO, Levine JD (1990) Effects of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism on cutaneous nociceptive threshold in the rat. *Brain Res* 537(1-2): 372-4.
- Tegeder I, Neupert W, Guhring H, Geisslinger G (2000) Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostanoid release from various rat organs. *J Pharmacol Exp Ther* 292(3): 1161-8.
- Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G (2001) Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *Faseb J* 15(12): 2057-72.
- Tonai T, Taketani Y, Ueda N, Nishisho T, Ohmoto Y, Sakata Y, Muraguchi M, Wada K, Yamamoto S (1999) Possible involvement of interleukin-1 in cyclooxygenase-2 induction after spinal cord injury in rats. *J Neurochem* 72(1): 302-9.
- Torebjork HE, Lundberg LE, LaMotte RH (1992) Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. *J Physiol* 448: 765-80.
- Turnbach ME, Randich A (2001) The effect of spinal and systemic administration of indomethacin on zymosan-induced edema, mechanical hyperalgesia, and thermal hyperalgesia. *J Pain* 2(1): 25-35.
- Turnbach ME, Spraggins DS, Randich A (2002) Spinal administration of prostaglandin E(2) or prostaglandin F(2alpha) primarily produces mechanical hyperalgesia that is mediated by nociceptive specific spinal dorsal horn neurons. *Pain* 97(1-2): 33-45.
- Uda R, Horiguchi S, Ito S, Hyodo M, Hayaishi O (1990) Nociceptive effects induced by intrathecal administration of prostaglandin D2, E2, or F2 alpha to conscious mice. *Brain Res* 510(1): 26-32.
- Urban L, Naeem S, Patel IA, Dray A (1994) Tachykinin induced regulation of excitatory amino acid responses in the rat spinal cord in vitro. *Neurosci Lett* 168(1-2): 185-8.
- van Arman CG, Carlson RP, Risley EA, Thomas RH, Nuss GW (1970) Inhibitory effects of indomethacin, aspirin and certain other drugs on inflammations induced in rat and dog by carrageenan, sodium urate and ellagic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 175(2): 459-68.
- Vane J (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231: 232-5.
- Vanegas H, Schaible HG (2001) Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog Neurobiol* 64(4): 327-63.
- Vasko MR (1995) Prostaglandin-induced neuropeptide release from spinal cord. *Prog Brain Res* 104: 367-80.
- Vasquez E, Bar KJ, Ebersberger A, Klein B, Vanegas H, Schaible HG (2001) Spinal prostaglandins are involved in the development but not the maintenance of inflammation-induced spinal hyperexcitability. *J Neurosci* 21(22): 9001-8.
- Watkins JC, Evans RH (1981) Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21: 165-204.
- Willingale HL, Gardiner NJ, McLymont N, Giblett S, Grubb BD (1997) Prostanoids synthesized by cyclooxygenase isoforms in rat spinal cord and their contribution to the development of neuronal hyperexcitability. *Br J Pharmacol* 122(8): 1593-604.

- Woolf CJ (1983) Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* 306(5944): 686-8.
- Woolf CJ, Thompson SW (1991) The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* 44(3): 293-9.
- Woolf CJ, Salter MW (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288(5472): 1765-9.
- Yaksh TL, Dirig DM, Conway CM, Svensson C, Luo ZD, Isakson PC (2001) The acute antihyperalgesic action of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs and release of spinal prostaglandin E2 is mediated by the inhibition of constitutive spinal cyclooxygenase-2 (COX-2) but not COX-1. *J Neurosci* 21(16): 5847-53.
- Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N (1996) Analysis of the effects of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and NS-398, a COX-2 selective inhibitor. *Brain Res* 739(1-2): 104-10.
- Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N (1997) Role of spinal cyclooxygenase (COX)-2 on thermal hyperalgesia evoked by carrageenan injection in the rat. *Neuroreport* 8(9-10): 2179-82.
- Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N (2002) The role of cyclooxygenase-1 and -2 in the rat formalin test. *Anesth Analg* 94(4): 962-7, table of contents.
- Yang LC, Marsala M, Yaksh TL (1996a) Characterization of time course of spinal amino acids, citrulline and PGE2 release after carrageenan/kaolin-induced knee joint inflammation: a chronic microdialysis study. *Pain* 67(2-3): 345-54.
- Yang LC, Marsala M, Yaksh TL (1996b) Effect of spinal kainic acid receptor activation on spinal amino acid and prostaglandin E2 release in rat. *Neuroscience* 75(2): 453-61.
- Zhang Y, Shaffer A, Portanova J, Seibert K, Isakson PC (1997) Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. *J Pharmacol Exp Ther* 283(3): 1069-75.
- Zimmermann M (1994) Epidemiologie des Schmerzes. *Internist* 35: 2-7.

ANHANG

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. Hans-Georg Schaible für die Überlassung des Promotionsthemas sowie für die geduldige und motivierende Beratung und Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit

Frau PD Dr. rer. nat. Andrea Ebersberger für die Beantwortung kleiner und großer Fragen sowie für die äußerst kritische Auseinandersetzung mit dem Manuskript

Herrn Dr. med. Alejandro Telleria-Diaz für die praktische und mentale Unterstützung während der Experimente

Frau Gabi Cuny für die gewissenhafte Vorbereitung der Versuchsutensilien, ihre schnelle Einsatzbereitschaft und technische Unterstützung bei allerhand unvorhergesehenen Notfällen

dem IZKF für die finanzielle Unterstützung in Form eines 6-monatigen Promotionsstipendiums

und last but not least meinen Eltern, Schwestern und Freunden, die mich besonders in der „kritischen Endphase“ der Verfassung dieser Arbeit immer wieder angespornt, aufgeheitert und abgelenkt haben.

Ihnen sei diese Arbeit gewidmet.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum: 18.08.1979
Geburtsort: Karl-Marx-Stadt
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

SCHULAUSBILDUNG

1985-1992 Gund- und Mittelschule, Glauchau
1992-1995 Leistungsklasse, Georgius-Agricola-Gymnasium, Glauchau
1995-1996 Parkview Education Center, Bridgewater, N.S., Canada
1996-1998 Abitur, Georgius-Agricola-Gymnasium, Glauchau

WEITERFÜHRENDE AUSBILDUNG

1998-2000 Vorklinischer Abschnitt des Medizinstudiums, Friedrich-Schiller-Universität Jena, September 2000 - Physikum
2000-2001 Erster klinischer Abschnitt des Medizinstudiums, FSU Jena, August 2001 - Erstes Staatsexamen
2001-2003 Zweiter klinischer Abschnitt des Medizinstudiums, FSU Jena, September 2003 - Zweites Staatsexamen
Okt. 2003- IZKF-Promotionsstipendium, Forschungssemester am Institut für
März 2004 Neurophysiologie der FSU Jena
April 2004- Praktisches Jahr:
März 2005 Innere Medizin, Letterkenny General Hospital, Irland
Chirurgie, Gondar College of Medical Science, Äthiopien
Urologie, Klinik für Urologie, Jena
Juni 2005 Drittes Staatsexamen, Erteilung der Approbation

PRAKTIKA

1999-2002 Pflegepraktika (Innere Medizin - Kreiskrankenhaus Rudolph Virchow, Glauchau; Chirurgische Intensivtherapiestation - Klinikum der FSU Jena), Famulaturen (Allgemeinarztpraxis - Dr. med. H. Bauer, Leipzig; Pädiatrie - Kinderklinik der FSU Jena; Gynäkologie - Zomba Central Hospital, Malawi; Chirurgie - University Teaching Hospital Lusaka, Sambia)

Jena, 5. Mai 2006

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß

mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich diese Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben:

Prof. Dr. med. Hans-Georg Schaible

PD Dr. rer. nat. Andrea Ebersberger

Dr. med. Alejandro Telleria-Diaz,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,

Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für die Leistungen erhalten haben, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 5. Mai 2006

Anne-Kathrin Neubert